

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE FARMÁCIA



RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM ANÁLISES CLÍNICAS  
Nas valências de Microbiologia, Bioquímica e Hematologia

Rui Sérgio Mendes Leite Pereira da Cunha  
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS  
2011

## Índice

Introdução – Monografia e Relatório de Estágio	2
Monografia – Estudo de uma série de urinas asséticas positivas. Estirpes bacterianas e suscetibilidade aos antibióticos na perspetiva do tratamento empírico	
Resumo	6
Abreviaturas	6
Introdução	7
Métodos	8
Resultados e discussão	10
Conclusões	45
Crítica	46
Perspetivas futuras	47
Apêndice	48
Bibliografia	50
Relatório de Estágio – Valência de Bioquímica	
Abreviaturas	51
Planificação do trabalho na valência de Bioquímica	52
Linearidade e diluições	54
Controlo da Qualidade Interno (CQI)	56
Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)	62
Amostras biológicas e algumas considerações sobre a fase pré-analítica	65
Preparação do utente e fase pré-analítica	66
Soro hemolisado – um exemplo de aplicação à rotina em grande escala	66
Condições de colheita adequadas a cada determinação	68
Preparação das amostras para HPLC	75
Conclusões	75
Bibliografia	76
Relatório de Estágio – Valência de Hematologia	
Abreviaturas	79
Introdução	80
Patologia da série vermelha	82
Alterações benignas da linhagem mieloide	101
Patologia da linhagem mieloide	106
Patologia da linhagem linfóide	116
Patologia viral	120
Particularidades	124
Considerações finais	131
Bibliografia	133
Apêndice	134
Agradecimentos	137

## **Introdução**

Quando após 4 anos de prática profissional em análises clínicas se tem a oportunidade de iniciar um mestrado na área, o interesse e a motivação são enormes.

Durante os primeiros anos de prática laboratorial são inevitáveis as dificuldades e dúvidas e é frequente ter a necessidade de pesquisar, procurar fontes, questionar colegas. De repente tem-se a felicidade de ter Professores que já fizeram o esforço de investigar o conhecimento teórico e prático para o transmitir aos alunos, ou de escutar o saber de outros profissionais de saúde com mais anos de experiência e verificamos que estes professores são uma excelente oportunidade para melhorar as competências profissionais. Esta foi a minha primeira impressão quando iniciei o mestrado e regresssei aos “bancos da escola” uns 8 anos após a conclusão da licenciatura, impressão que se manteve e se confirmou à medida que fui frequentando todo o plano curricular do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia de Lisboa (MAC).

Por fim chega o período de Estágio, e quem tiver alguma experiência profissional, tem a consciência que o mundo das análises clínicas é muito vasto. O estagiário coloca-se diante de uma opção: ou escolhe especializar-se em áreas com as quais já está familiarizado, ou, como foi o meu caso, pode pretender alargar a experiência profissional a áreas de trabalho em que tem menos experiência, para se tornar mais flexível e versátil no Laboratório. Assim, sendo a minha experiência profissional prevalentemente nas áreas da imunoserologia, urianálise, foram as áreas a que dei menor atenção.

Estagiei portanto nas áreas em que queria completar o meu conhecimento prévio ou em que sentia algumas lacunas, sempre respeitando a carga horária indicada para cada valência. Dadas as especificidades de cada valência, em cada uma, a experiência do estágio foi diferente e os aspetos sobre os quais vou incidir no relatório vão ser também diferentes. Procuro assim não seguir um esquema pré-definido igual para todas as valências, mas distribuir os vários aspetos críticos do processo analítico pelas diferentes valências de forma a ter um todo o mais completo possível e não repetitivo. O relatório, assim distribuído, espelha o trabalho prático efetuado ao longo do estágio, que em cada valência focou diferentes aspetos complementares.

No meu estágio, tive ainda a possibilidade de estagiar em locais diferentes e configurar um plano de estágio à medida dos meus interesses. Iniciei o estágio no Labomarques em Fevereiro 2010 em Microbiologia, passando depois à Hematologia e Bioquímica, continuei a partir de Abril 2010 no core laboratorial do Laboratório Joaquim Chaves onde completei a Hematologia e Bioquímica, com breves passagens pela Química Analítica e pela Biologia Molecular das Doenças Infecciosas. Terminei o meu estágio com um pequeno módulo de colheitas por punção venosa no Labquer para aperfeiçoar a técnica de colheita por vácuo. Pude assim conhecer melhor diferentes aspetos da mesma realidade, respetivamente um laboratório com 200 utentes/dia, outro com cerca de 1500 utentes/dia e outro de uma pequena localidade fora dos grandes centros urbanos com 30 a 40 utentes/dia.

Na área da Microbiologia, recolhi os dados de uma série de urinas assépticas positivas que foram processadas no Laboratório. Recolhi os dados do exame a fresco ao microscópio, a estirpe em questão, os perfis de resistência aos antibióticos e dados demográficos e clínicos. Embora com uma amostragem pouco mais que mínima, o tratamento estatístico permitiu quer tirar algumas conclusões sobre a população estudada. Embora já tivesse colaborado desde 2006 no processo analítico do Sector de Microbiologia, uma coisa é ter uma ideia das estirpes mais prevalentes e dos antibióticos com mais resistências na população, outra é tratar esses dados e ter um conhecimento mais objetivo e claro.

No Sector de Hematologia, dediquei boa parte do tempo à observação de esfregaços normais e com patologia sobretudo da série branca, a mais difícil, mas também da série vermelha e da série megacariocítica. Dediquei também algum tempo ao trabalho mais técnico da operação de equipamentos e execução de técnicas manuais.

No Sector de Bioquímica dediquei algum tempo ao controlo interno e controlo externo da qualidade. Dediquei um pequeno bloco às condições de colheita das amostras para os diferentes parâmetros e para a garantia de qualidade ao longo de todo o processo analítico. Dediquei algum tempo ao trabalho técnico de operação dos equipamentos automatizados e à rotina diária. No Sector de Química Analítica do Lab. Dr. Joaquim Chaves contatei com a preparação das amostras para HPLC e com outras técnicas especiais que aí se fazem.

No Sector de Biologia Molecular das Doenças Infecciosas estive pouco tempo mas foi muito útil dada a minha anterior experiência na montagem e acompanhamento de um sector análogo no Labomarques. Neste Sector foram para mim particularmente impressionantes o volume de trabalho e a automatização da grande maioria dos processos que permite uma a rentabilização dos recursos e a execução de grande número e parâmetros.

No que diz respeito à colheita de amostras biológicas já tinha executado no passado punção venosa pelo sistema convencional, mas faltava-me experiência pelo sistema de vácuo. No pequeno laboratório de Alenquer comecei a executar a punção venosa por vácuo à segunda de cinco semanas de estágio. É claro que a confiança e a excelência surgem apenas após meses ou anos de prática, mas por algum lado é preciso começar.

## Monografia de Estágio

Estudo de uma série de urinas assépticas positivas  
Estirpes bacterianas e suscetibilidade aos antibióticos  
na perspectiva do tratamento empírico

## **Resumo**

A infeção urinária é uma das infeções mais frequentes na comunidade e a urina assética é a amostra com maior representatividade no laboratório de microbiologia no ambulatório.

Com o presente estudo pretende-se conhecer a prevalência das estirpes bacterianas neste tipo de infeções na população, assim como a sua suscetibilidade aos antibióticos. Esta informação é essencial na terapêutica empírica e o uso racional destes fármacos.

Para este estudo são recolhidas e analisadas pelos métodos padrão, todas as urinas de uma série de um mês (Fevereiro de 2010) no Labomarques em Sintra. Os resultados positivos são incluídos nesta amostragem, através da qual se pretende conhecer melhor a população que recorre aos serviços do Laboratório e comparar os resultados com os de estudos análogos em Portugal e no estrangeiro. Os resultados deste estudo podem ser um contributo útil ao clínico no ato da prescrição.

## **Abstract**

Urinary tract infection is one of the most common in the community and the urine culture is the most representative clinical sample in the ambulatory microbiology laboratory.

The aim of the present study is to know the prevalence of bacterial strains in the population and their antibiotic susceptibility. This information is critical in empiric therapy and appropriate antibiotic use.

A series of urinary samples is collected and analyzed by standard procedures, during a month (February 2010) in Labomarques in Sintra, Portugal. Positive results are included in this study aiming to achieve a better knowledge of the population requiring the Laboratory services as well as to compare the results with similar studies in Portugal and abroad. These results can provide a useful contribution for the clinician's prescription.

## **Abreviaturas**

Ufc – Unidades formadoras de colónias

TMP-STX – Trimetoprim-sulfametoxazole

CMI – concentração mínima inibitória

## **Introdução**

A terapêutica empírica é uma abordagem necessária no tratamento da infecção urinária, que requer o conhecimento das estirpes presentes numa dada população e das suas resistências aos antibióticos.

As resistências existentes numa população variam com a pressão seletiva resultante da toma de antibióticos. O conhecimento das resistências numa população é essencial para uma prescrição eficaz, sobretudo no contexto da terapêutica empírica. O acompanhamento das resistências ao longo do tempo pode contribuir a controlar o surgimento de estirpes multirresistentes e a evitar diminuir a utilidade terapêutica dos antibióticos disponíveis, em especial, os mais bem tolerados e com menor toxicidade nos vários estados fisiológicos (neonatal, crescimento, gravidez).

A estratificação da população em grupos de risco é a estratégia com melhor custo benefício. A segmentação de uma amostra em grupos de risco permite identificar a estirpes que mais frequentemente causam infecção em cada grupo, as suas resistências características e assim dar indicações mais específicas do que tratando a amostra como um todo.



## Métodos

A amostragem consistiu em 141 casos de infeção urinária recolhidos no Labomarques no mês de Fevereiro de 2010, por ocasião de um estudo<sup>1</sup> mais amplo realizado em 10 Laboratórios de Portugal continental. No ato da colheita foi preenchido um breve questionário em que são anotados o sexo, a idade, se está grávida, se é diabético, acamado ou algaliado, se teve infeções e tratamentos recentes e se sim, quais os antibióticos que tomou. A colheita foi efetuada após instrução dos utentes sobre as medidas de auto-assepsia. No caso de crianças e algaliados foram adotados os procedimentos de rotina destas colheitas. As amostras foram processadas como normalmente com a observação dos sedimentos ao microscópio, a sementeira de todas as amostras em meio CLED com hansa calibrada e incubação durante a noite em estufa a 37°C.

As amostras que obtiveram crescimento positivo em cultura pura igual ou superior a  $10^5$  ufc (unidades formadoras de colónias) e com morfologia da colónia característica de gram negativo, foram inoculadas em cartas de identificação GN no sistema Vitek 2 da Biomérieux® e foi feito antibiograma com a carta AST-N151 no sistema Vitek 2.

Nos casos de suspeita de *Pseudomonas aeruginosa*, além da carta GN e em vez da carta AST-N151, utilizou-se a carta de antibiograma específica para esta estirpe, a AST-N093.

Para as amostras que obtiveram crescimento positivo em cultura pura igual ou superior a  $10^5$  ufc e com morfologia da colónia característica de gram positivo, utiliza-se a técnica da catalase para diferenciar os *Staphylococcus* (que são catalase positivos) de *Enterococcus* e *Streptococcus* (que são catalase negativos). Consoante o resultado do teste da catalase, inoculam-se os presumíveis *Staphylococcus* (catalase +) em cartas de identificação GP e de antibiograma AST-P580 no sistema Vitek 2 e inoculam-se os presumíveis *Enterococcus* e *Streptococcus* em cartas de identificação GP e de antibiograma AST-P586 no sistema Vitek 2.

Os casos em que não haja cultura pura ou o crescimento seja inferior a  $10^5$  ufc são avaliados consultando o histórico e todos os dados do doente, como idade, queixas, presença de barreiras anatómicas como algália, ser acamado, existência de doença diabética e sedimento urinário. Com base nestes dados é tomada a decisão de valorizar ou não este crescimento bacteriano. No caso de se valorizar uma amostra com mais de um microrganismo pode ser necessário fazer repicagem para novos meios para isolar

melhor a(s) estirpe(s) em causa. Em alguns casos foi útil utilizar a repicagem para os meios MacConkey e CNA que são seletivos, respetivamente para bactérias de gram negativo e bactérias de gram positivo para obter melhor isolamento.

Em todos os casos em que são feitas cartas de identificação ou de antibiograma, são executados em paralelo re-isolamentos para os meios respetivos como salvaguarda de manutenção de uma cultura fresca para o dia seguinte caso seja necessário repetir ou uma identificação ou um antibiograma.

Os testes executados em cada carta e considerados neste estudo são:

Carta AST-N151: amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefalotina, cefuroxima, cefuroxima axetil, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina, levofloxacina, gentamicina, ampicacina, tobramicina, piperacilina + tazobactam, meropenem, nitrofurantoína, trimetoprim-sulfametoxasole. É também pesquisada a presença de  $\beta$ -lactamase de espectro alargado.

Carta AST-N093: ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, ampicacina, tobramicina, piperacilina+tazobactam, imipenem, meropenem, Trimetoprim-Sulfametoxasole.

Carta AST-P586: penicilina G, amoxicilina, cefuroxima, cefuroxima axetil, levofloxacina, vancomicina, tetraciclina, gentamicina, imipenem, nitrofurantoína, trimetoprim-sulfametoxasole.

Carta AST-P580: penicilina G, amoxicilina, levofloxacina, teicoplanina, vancomicina, tetraciclina, gentamicina, fosfomicina, nitrofurantoína, trimetoprim-sulfametoxasole.

Em cada uma das cartas são ainda executados outros testes de suscetibilidade, que porém não são dados no boletim de resultados do laboratório nem são considerados no presente estudo por não serem indicados no tratamento da infeção urinária (ex. eritromicina, mupirocina).

Todos os resultados quer dos inquéritos, quer da observação microscópica, resultados culturais, identificação e antibiogramas foram carregados numa base de dados, com vista à sua análise e tratamento estatístico.

Dado que o objetivo do estudo é produzir informação útil no tratamento empírico da infeção urinária, todos os resultados “intermédio” nos testes de suscetibilidade aos antibióticos são reportados como “resistente”, dado que é assim que são considerados no contexto clínico.

## Resultados e Discussão

Dos 141 casos que constituem esta amostra, 121 (86%) são mulheres e 20 (14%) são homens, o que resulta num rácio F/M de 6,1.

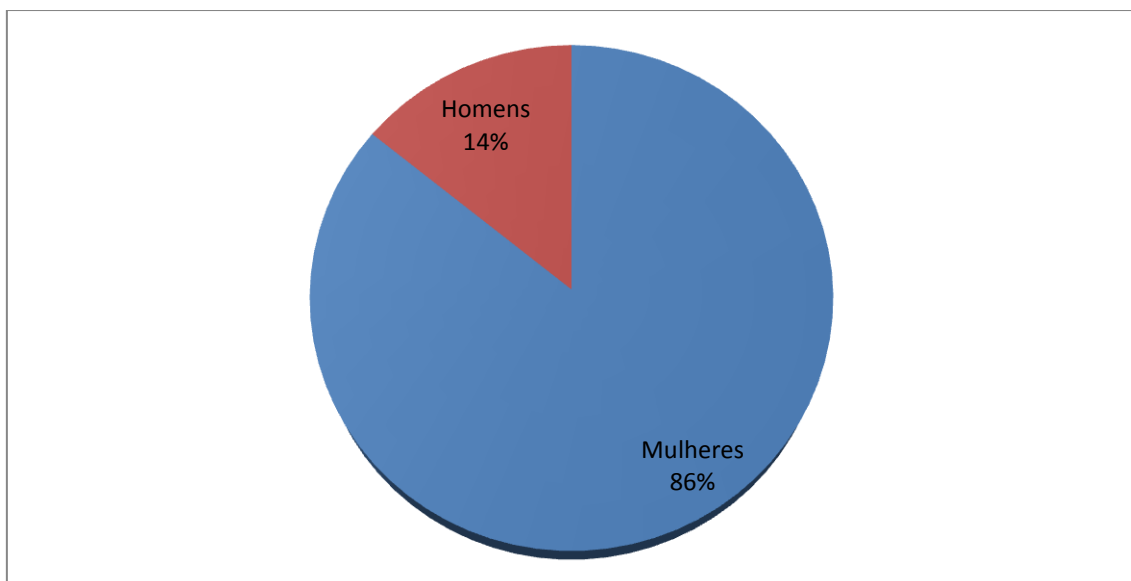


Gráfico 1.1 – Distribuição dos casos de infeção urinária por sexo em valores percentuais.

Tal como em outros estudos, a distribuição etária tem dois picos: um na meia-idade, entre os 30 e os 39 anos e outro a partir dos 70 anos. A média de idades na população total é de 53,4 anos.

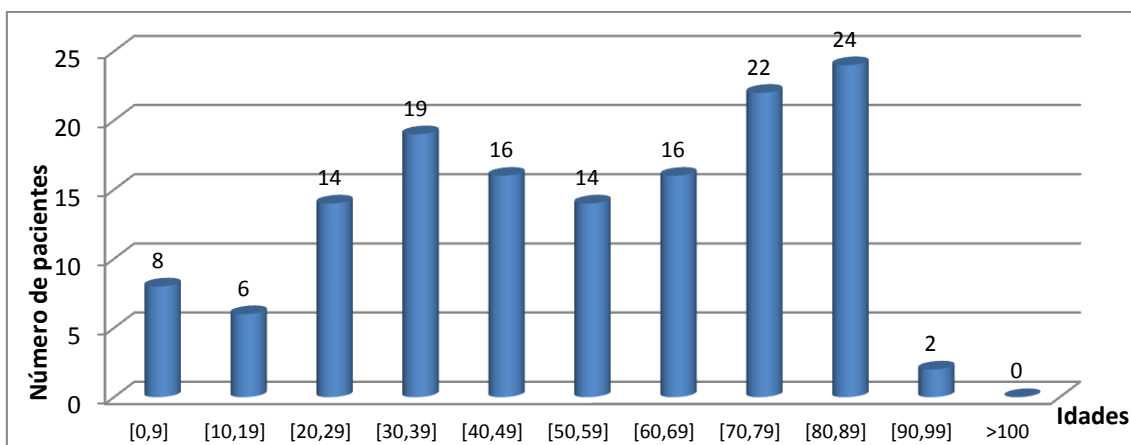


Gráfico 1.2 – Distribuição dos casos de infeção urinária por faixa etária em valor absoluto.

Na amostra existem 6 mulheres e 5 homens em que foi considerada a positividade em duas estirpes diferentes, e assim contamos com 152 isolados. A média das idades entre os portadores de dupla infeção é de 78,1 anos, enquanto no resto da população, que tem unicamente infeção simples, a média é de 51,3 anos, o que pode evidenciar como a idade é um fator de risco para infeção complicada. Por outro lado, à medida que a idade

avança, as dificuldades na higiene pessoal, as alterações anatómicas, na mulher o desaparecimento do pH ácido protetor na vagina, e por vezes a necessidade de recurso a algália facilitam a colonização da uretra e da bexiga, tornando mais difícil o isolamento de estirpes em cultura pura nos casos de infeção urinária.

Nesta amostra as estirpes mais frequentes são *Escherichia coli* com 71,7% dos isolados, seguida de *Klebsiella pneumoniae* com 7,2% dos casos. Ao todo, as estirpes de gram negativo contam com 92,8% dos casos, enquanto as bactérias de gram positivo contam com apenas 7,2% dos casos, sendo destas a estirpe *Enterococcus faecalis* a mais representativa com 4,6% dos casos.

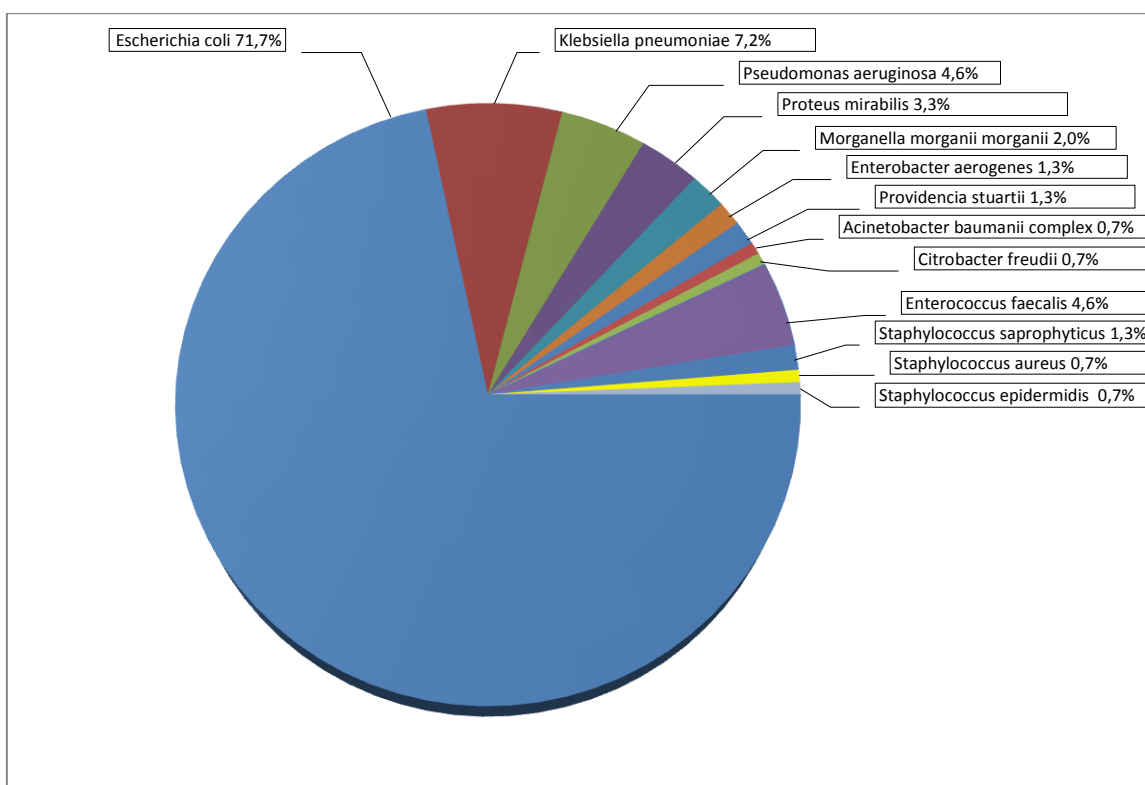


Gráfico 1.3 – Distribuição dos casos de infeção urinária por estirpe bacteriana em valores percentuais. As estirpes de gram positivo encontram-se agrupadas no lado direito do gráfico

Quanto à observação dos sedimentos, verificou-se que 85,1% dos casos possuem número de células poliédricas de descamação epitelial inferior a 10 por mL. A presença de células epiteliais no sedimento urinário para urocultura é um indicador de contaminação. A monitorização deste parâmetro pode indicar a necessidade de medidas corretivas com vista a melhorar a instrução dos pacientes no ato de auto-descontaminação que precede a colheita. Dos 9 casos que têm um sedimento com 20 ou mais células por mL (que correspondem a 6,4% das amostras) todos de mulheres, 4 têm 80 anos ou mais estando uma delas acamada, 2 estão na faixa dos 40 anos, 1 na faixa

dos 30 e 2 na faixa dos 20 anos. Embora o Laboratório receba amostras de domicílios, lares de idosos com pessoas acamadas e outros doentes com dificuldades de higiene pessoal, nesta amostragem não parecem ser essas as causas principais da existência de amostras de urina para urocultura contaminadas com células.

Tabela 1.1 – Células epiteliais observadas no exame citológico distribuídas por classes.

Células no sedimento	N.º de casos	% de casos
$\leq 10$	120	85%
11 a 20	12	9%
21 a 100	7	5%
$>100$	2	1%

Quanto à leucocitúria, o dado mais relevante é o facto de 24,1% das urinas positivas não apresentarem leucocitose significativa (acima dos 10 leucócitos/mL) o que em termos práticos significa que 1 em cada 4 urinas positivas não apresenta leucocitúria.

Tabela 1.2 – Leucócitos observados no exame citológico distribuídos por classes.

Leucócitos no sedimento	N.º de casos	% de casos
$\leq 10$	34	24%
11 a 20	7	5%
21 a 100	40	28%
$>100$	60	43%

Da mesma forma, para a hematúria, 58,9% dos casos analisados não apresentavam vestígios de eritrócitos e 19,9% dos casos apresentavam hematúria reduzida (até 10 eritrócitos/mL).

Tabela 1.3 – Eritrócitos observados no exame citológico distribuídos por classes.

Eritrócitos no sedimento	N.º de casos	% de casos
0	83	59%
$>1 \text{ e } \leq 10$	28	20%
11 a 20	4	3%
21 a 100	16	11%
$>100$	10	7%

Nos casos em que é pedida urocultura e urina tipo II para a mesma amostra e é detetada hemoglobinúria na tira-teste sem eritrócitos visíveis no exame citológico por lise destes, os valores de eritrócitos são corrigidos no exame citológico da urocultura para evitar os falsos negativos.

Se nos abstrairmos do facto de a infeção urinária ser mais frequente na mulher (nesta amostra existem 6 infeções em mulheres por cada uma que existe no homem) e analisarmos os resultados da amostra por género e por faixas etárias, vemos que infeção urinária no homem e na mulher segue uma distribuição ligeiramente diferente nas várias faixas etárias.

Encontramos diferenças significativas nas faixas etárias dos 20 aos 50 anos, sendo a faixa etária dos 30 anos onde esta diferença é mais evidente. Para isto contribuem a atividade sexual que facilita a contaminação da uretra feminina pela flora intestinal e também as gestações que ocorrem sobretudo nesta fase da vida (a amostra contém 12 grávidas).

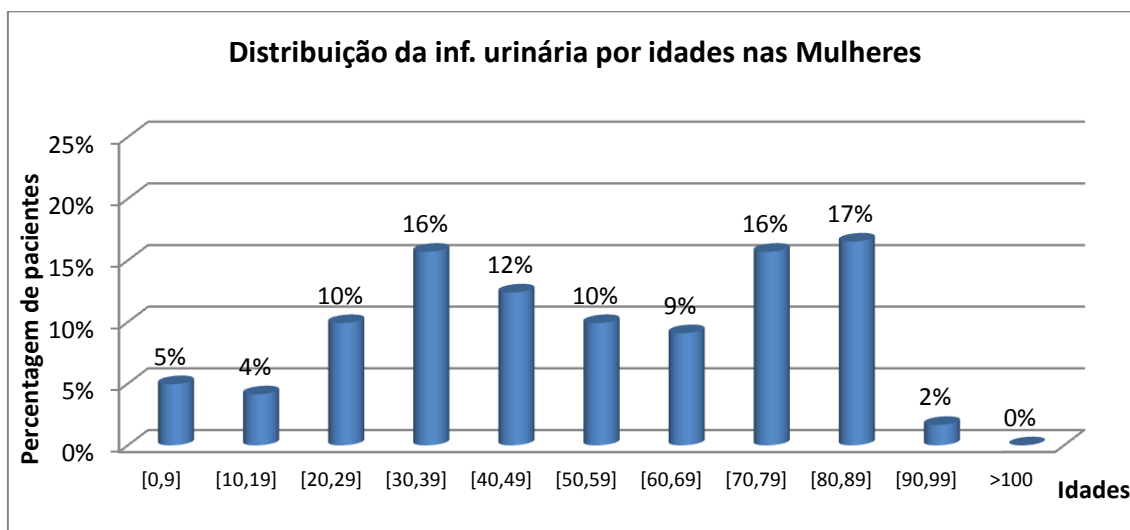


Gráfico 1.4 – Distribuição dos casos de infecção urinária na mulher por faixas etárias em valores percentuais.

Outra faixa etária em que se notam diferenças significativas é a partir dos 50 anos de idade e sobretudo na faixa etária dos 60 aos 69 anos em que se manifestam no homem a hiperplasia e as inflamações da próstata, que predispoem para infecção.

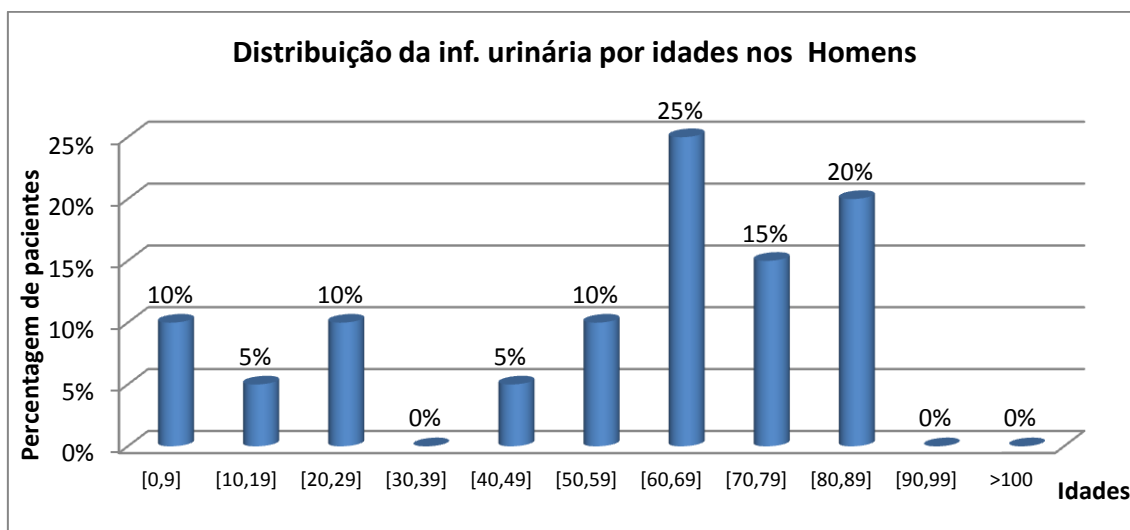


Gráfico 1.5 – Distribuição dos casos de infecção urinária no homem por faixas etárias em valores percentuais.

Tal como ilustrado na Tabela 1.4 as frequências de infeção urinária nos dois sexos são mais próximas nas faixas etárias da infância, adolescência e velhice, afastando-se (maior rácio F/M) na meia-idade pelos motivos já previamente enunciados.

Tabela 1.4 – Número de infeções urinárias por faixa etária e por sexo na amostra total em valores absolutos e rácio F/M.

Faixas etárias	Número total de infeções	Infeções na mulher	Infeções no homem	Rácio F/M
[0,9]	8	6	2	3
[10,19]	6	5	1	5
[20,29]	14	12	2	6
[30,39]	19	19	0	> 19
[40,49]	16	15	1	15
[50,59]	14	12	2	6
[60,69]	16	11	5	2,2
[70,79]	22	19	3	6,3
[80,89]	24	20	4	5
[90,99]	2	2	0	> 2
>100	0	0	0	–



Por ser a estirpe mais prevalente na infecção urinária e também na nossa amostra, reportam-se aqui os perfis de sensibilidade para os isolados de *Escherichia coli*. Os antibióticos de primeira linha quer no tratamento da infecção urinária, quer de outras infecções humanas, têm menores percentagens de sensibilidade.

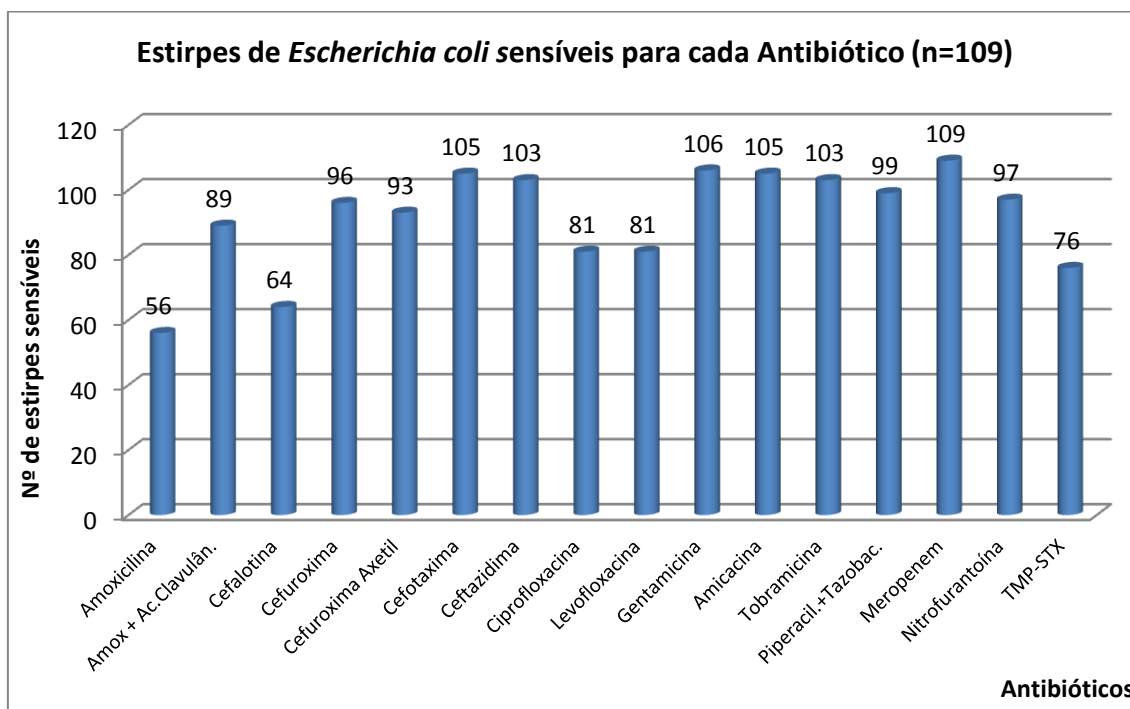


Gráfico 1.6 – Número de estirpes de *Escherichia coli* sensíveis a cada um dos antibióticos testados. Os antibióticos de reserva ou os menos utilizados são os que apresentam menores taxas de resistência.

Numa amostragem de pequenas dimensões como a nossa, o estudo dos perfis de resistência de outras estirpes que não sejam de *Escherichia coli* depara-se com o problema de termos um número muito reduzido de isolados, que não permite um tratamento estatístico com resultados representativos. Por este motivo estudamos apenas *Escherichia coli*.

O tratamento empírico requer o conhecimento da população alvo. Numa primeira abordagem, compilamos na Tabela 1.5 todos os dados dos testes de suscetibilidade realizados aos vários isolados por antibiótico.

Tabela 1.5 – Testes de suscetibilidade realizados contra os vários isolados. O número de antibióticos testados é variável porque depende de cada carta de antibiograma e da estirpe testada.

	Penicilina G	Amoxicilina	Amox+Ac.Clavul.	Cefalotina	Cefuroxima	Cefurox Axetil	Cefotaxima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Teicoplanina	Vancomicina	Tetraciclina	Gentamicina	Fosfomicina	Amicacina	Tobramicina	Piperac+Tazobac	Imipenem	Meropenem	Nitrofurantoína	TMP-STX
Estirpes Sensíveis (a)	4	64	103	76	115	109	127	132	108	112	4	11	2	137	2	137	132	123	13	140	113	100
Estirpes Resistentes	7	81	32	59	27	33	8	9	33	34	0	0	9	8	2	4	9	18	1	0	33	52
Estirpes Testadas (b)	11	145	135	135	142	142	135	141	141	146	4	11	11	145	4	141	141	141	14	140	146	152
% de estirpes sensíveis (a/b)	36%	44%	76%	56%	81%	77%	94%	94%	77%	77%	100%	100%	18%	94%	50%	97%	94%	87%	93%	100%	77%	66%
% de estirpes sensíveis no total amostral (a/152)	3%	42%	68%	50%	76%	72%	84%	87%	71%	74%	3%	7%	1%	90%	1%	90%	87%	81%	9%	92%	74%	66%

Ao antibióticos penicilina G, vancomicina e tetraciclina são testados apenas contra os isolados de gram positivo, a teicoplanina e fosfomicina são testados apenas contra os isolados de Staphilococcus e o imipenem é testado apenas contra Pseudomonas e Enterococcus.

Os resultados da penicilina G indicam uma percentagem de suscetibilidade de 36% nas estirpes estudadas, tal como a amoxicilina, o outro  $\beta$ -lactâmico estudado em maior número de amostras, não é opção na terapêutica empírica.

Os glicopéptidos, teicoplanina e vancomicina, têm percentagens de sensibilidade de 100% nas amostras estudadas, mas são antibióticos reservados para o tratamento de infeções por gram positivos. Estes antibióticos não são opção na terapêutica empírica, dado que apenas 10% das infeções urinárias em Portugal são causadas por bactérias de gram positivo<sup>2</sup>.

A fosfomicina é um antibiótico de largo espectro e com bons resultados no tratamento da infeção urinária, mas o facto de ser testado apenas em 4 isolados nesta amostragem impede-nos de considerar os seus resultados no tratamento estatístico.

O imipenem é um carbapenemo eficaz contra uma grande variedade de estirpes de gram positivo e de gram negativo, mas não é um antibiótico de primeira linha no tratamento da infecção urinária e a sua utilização está reservada a infecções complicadas<sup>3</sup>.

A tetraciclina é eficaz contra grande variedade de estirpes bacterianas e outros microorganismos. É amplamente utilizada no combate a infecções causadas por Chlamydia, Rickettsia, Brucella e Borrelia e também no tratamento da acne, pelo que raramente é utilizada no tratamento da infecção urinária<sup>4</sup>. A sua utilidade terapêutica tem vindo a diminuir como consequência do desenvolvimento de resistências. De facto na nossa amostra, 9 em 11 isolados são resistentes a este antibiótico.

Os restantes antibióticos são testados contra a maioria dos isolados e por isso os seus resultados são analisados nas páginas seguintes.

A cistite não complicada na mulher jovem é causada por um grupo previsível de estirpes. Na nossa base de dados filtramos todas as mulheres entre os 20 e os 49 anos, não grávidas e sem infecções de repetição. Neste grupo de 25 mulheres, 23 (92%) dos isolados são de *Escherichia coli*, 1 é de *Proteus mirabilis* e 1 é de *Enterococcus faecalis*.

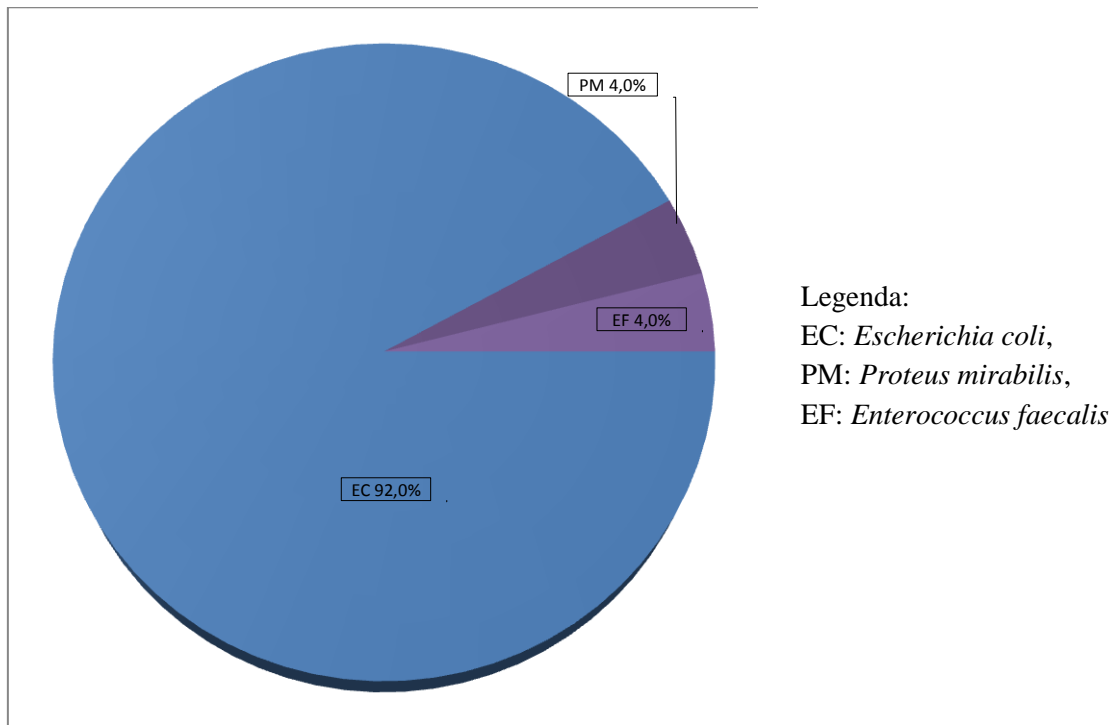
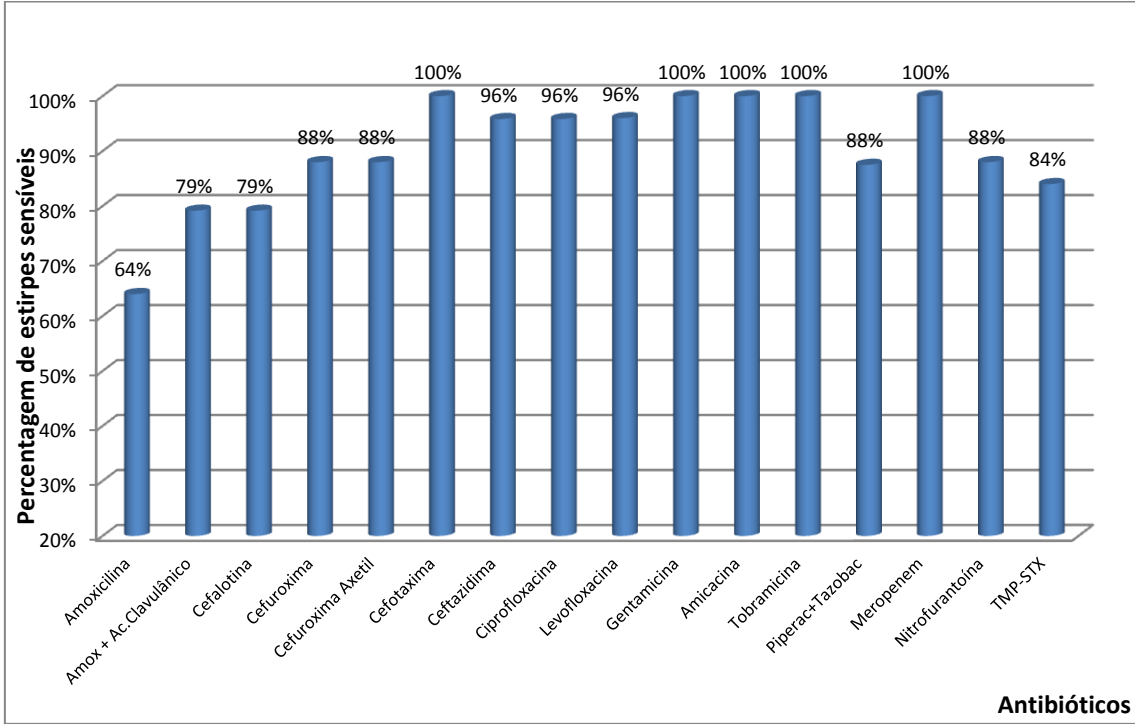


Gráfico 1.7 – Estirpes isoladas a partir de amostras de urina de mulheres entre os 20 e os 49 anos com infecção urinária. Foram excluídos os casos de infecção de repetição.

A frequência de *Escherichia coli* neste subgrupo é superior à sua frequência na restante população, o mesmo acontecendo ao grupo das bactérias de gram negativo.

Estas estirpes apresentam baixa resistência aos antibióticos de primeira linha. O trimetoprim-sulfametoxasole e a nitrofurantoína que foram testados contra todas as estirpes, apresentam uma sensibilidade de respetivamente 84% e 88%. A associação amoxicilina + ácido clavulânico, a cefalotina e a cefuroxima apresentam respetivamente sensibilidades de 79%, 79% e 88%.



	Amoxicilina	Amox + Ac.Clavulânico	Cefalotina	Cefuroxima	Cefuroxima Axetil	Cefotaxima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Gentamicina	Amicacina	Tobramicina	Piperac+Tazobac	Meropenem	Nitrofurantoína	TMP-STX
n.º de estirpes testadas	25	24	24	25	25	24	24	24	25	24	24	24	24	24	25	25
% de estirpes sensíveis	64%	79%	79%	88%	88%	100%	96%	96%	96%	100%	100%	100%	88%	100%	88%	84%

Gráfico 1.8 – Estirpes sensíveis no subgrupo de mulheres entre os 20 e os 49 anos em valores percentuais excluindo os casos de infeção de repetição. O número de estirpes testadas contra cada antibiótico é um indicador da representatividade do valor obtido. Estão omissos os antibióticos que são testados contra um grupo muito reduzido de estirpes (menos de metade das estirpes do subgrupo), dada a reduzida representatividade desse resultado com vista à terapêutica empírica. O trimetoprim-sulfametoxasole é testado contra todas as estirpes e assim indica a dimensão do subgrupo em análise.

Se alargarmos o grupo a todas as mulheres entre os 20 e os 49 anos, não grávidas, e incluirmos todos os casos de infeções de repetição nos 12 meses precedentes à colheita, obtemos uma amostra de 46 casos em que surgem outras estirpes quer de bactérias de gram negativo quer de gram positivo. A estirpe *Escherichia coli* perde alguns pontos percentuais, mas continua a ter uma frequência superior à média da população em geral.

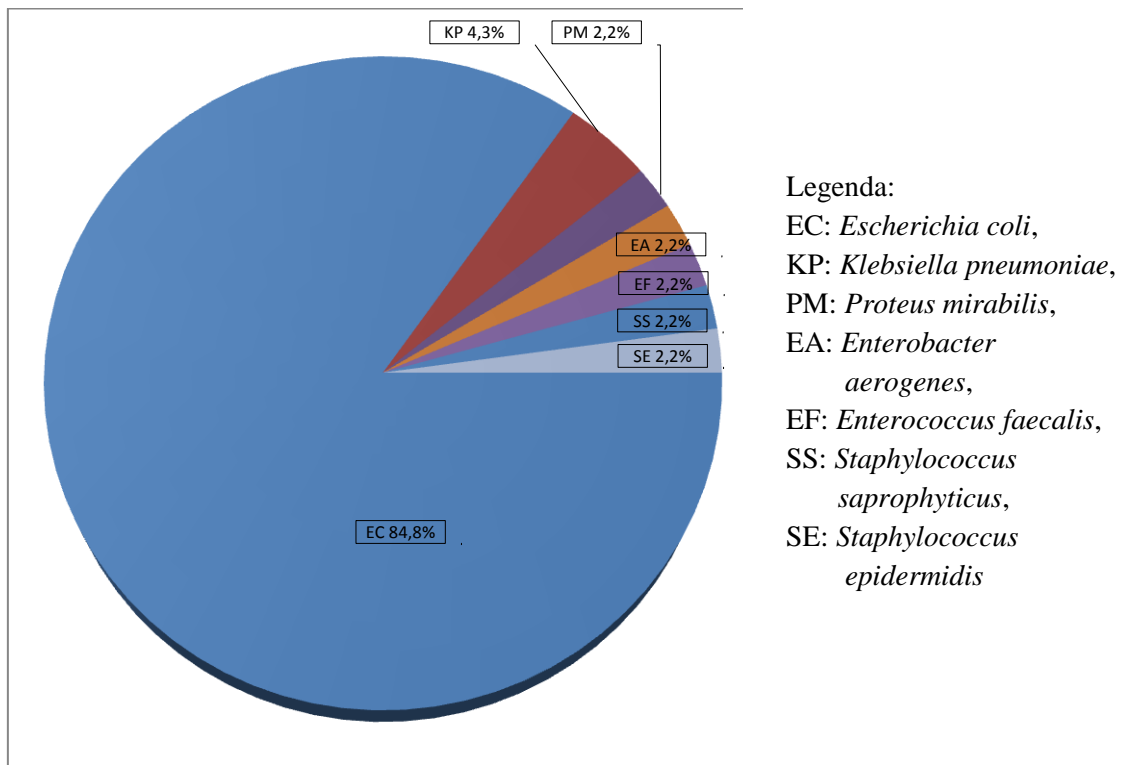
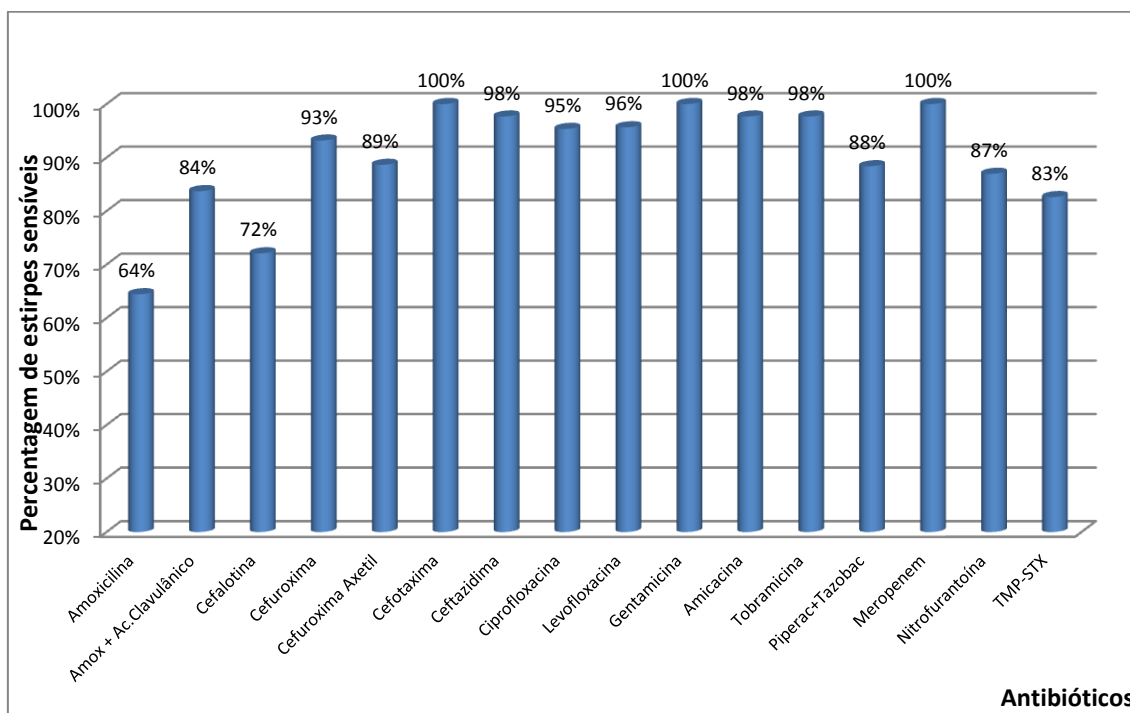


Gráfico 1.9 – Estirpes isoladas a partir de amostras de urina de mulheres entre os 20 e os 49 anos com infeção urinária. Incluem-se os casos de infeção de repetição.

Neste subgrupo temos 17 casos (37%) com 1 ou 2 infeções nos 12 meses precedentes à colheita e 4 casos (9%) com 3 ou mais episódios de infeção urinária nos 12 meses precedentes à infeção. O total de 21 casos com uma ou mais infeções nos 12 meses precedentes corresponde a 46% do subgrupo.

Não se observam alterações significativas nas resistências aos antibióticos relativamente ao grupo anterior, excetuando uma ligeira diminuição na percentagem de sensibilidade à cefalotina de 79% para 72%. No geral as opções terapêuticas mantêm-se.

Nestes dois grupos de mulheres entre os 20 e os 49 anos, nenhuma das estirpes apresenta  $\beta$ -lactamase de espectro alargado, por outro lado amoxicilina não se apresenta como alternativa na terapêutica empírica dada a sensibilidade em apenas 64% dos isolados em ambos os grupos.



	Amoxicilina	Amox + Ac.Clavulânico	Cefalotina	Cefuroxima	Cefuroxima Axetil	Cefotaxima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Gentamicina	Amicacina	Tobramicina	Piperac+Tazobac	Meropenem	Nitrofurantoina	TMP-STX
n.º de estirpes testadas	45	43	43	44	44	43	43	43	46	45	43	43	43	43	46	46
% de estirpes sensíveis	64%	84%	72%	93%	89%	100%	98%	95%	96%	100%	98%	98%	88%	100%	87%	83%

Gráfico 1.10 – Estirpes sensíveis no subgrupo de mulheres entre os 20 e os 49 anos, em valores percentuais, incluindo os casos de infeção de repetição. O número de estirpes testadas contra cada antibiótico é um indicador da representatividade do valor obtido. Estão omissos os antibióticos que são testados contra um grupo muito reduzido de estirpes (menos de metade das estirpes do subgrupo), dada a reduzida representatividade desse resultado com vista à terapêutica empírica. O trimetoprim-sulfametoxasole é testado contra todas as estirpes e assim indica a dimensão do subgrupo em análise.

O grupo das grávidas é composto apenas por 12 casos e não apresenta outras bactérias de gram negativo além de *Escherichia coli*. As bactérias de gram positivo contribuem com 25% dos casos de infecção.

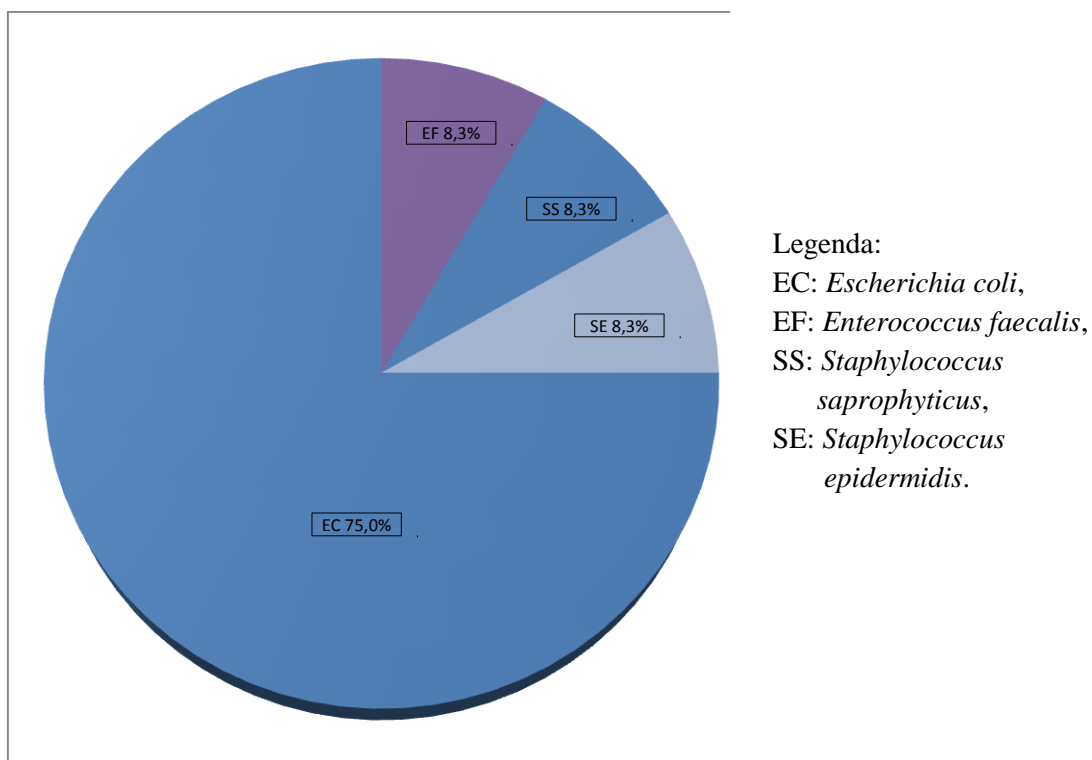
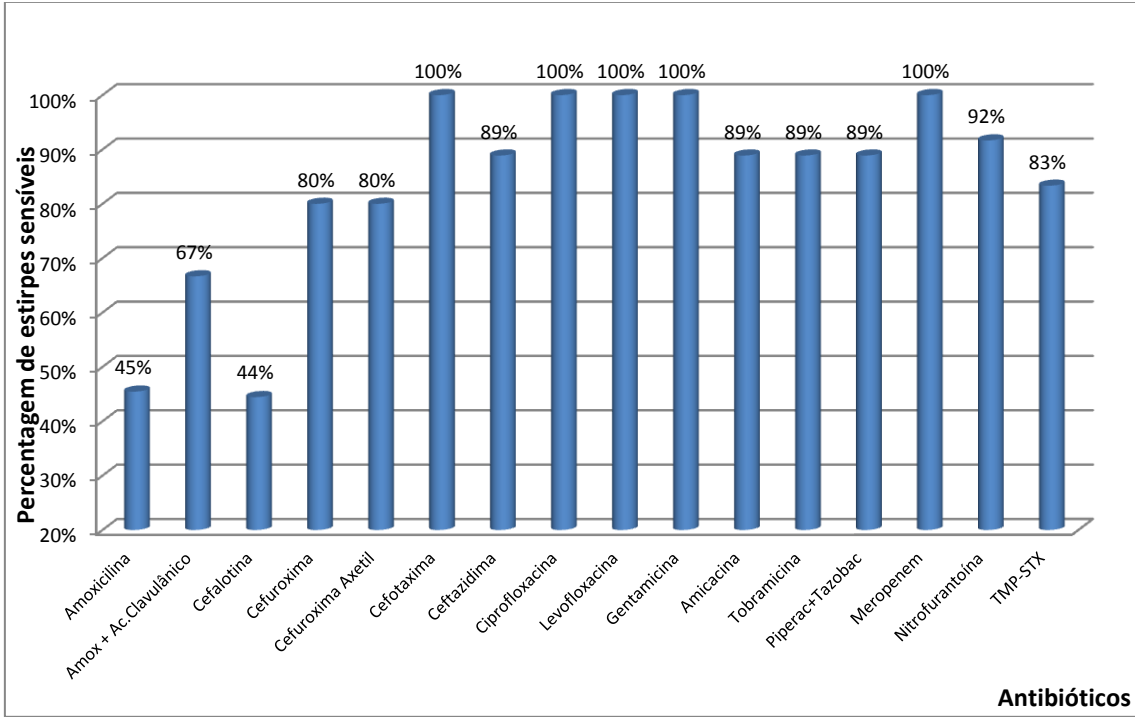


Gráfico 1.11 – Estirpes isoladas a partir de amostras de urina de grávidas com infecção urinária.



As estirpes isoladas neste grupo apresentam baixas taxas de sensibilidade a alguns dos antibióticos de primeira linha utilizados nas grávidas (amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico e cefalotina respectivamente com 45%, 67% e 44%). O recurso a uma cefalosporina de segunda geração como a cefuroxima com 80% de sensibilidade é uma opção. Se houver alguma condição que impeça a utilização deste  $\beta$ -lactâmico, o médico pode ponderar o custo benefício de opções como trimetoprim-sulfametoxasole ou nitrofurantoína desde que não seja no final da gravidez, dado que ambos apresentam boas percentagens de sensibilidade, respetivamente 83% e 92%.



	Amoxicilina	Amox + Ac.Clavulânico	Cefalotina	Cefuroxima	Cefuroxima Axetil	Cefotaxima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Gentamicina	Amicacina	Tobramicina	Piperac+Tazobac	Meropenem	Nitrofurantoína	TMP-STX
n.º de estirpes testadas	11	9	9	10	10	9	9	9	12	11	9	9	9	9	12	12
% de estirpes sensíveis	45%	67%	44%	80%	80%	100%	89%	100%	100%	100%	89%	89%	89%	100%	92%	83%

Gráfico 1.12 – Estirpes sensíveis no subgrupo grávidas, em valores percentuais. O número de estirpes testadas contra cada antibiótico é um indicador da representatividade do valor obtido. Estão omissos os antibióticos que são testados contra um grupo muito reduzido de estirpes (menos de metade das estirpes do subgrupo), dada a reduzida representatividade desse resultado com vista à terapêutica empírica. O trimetoprim-sulfametoxasole é testado contra todas as estirpes e assim indica a dimensão do subgrupo em análise.

Ao filtrar os dados por utentes com uma ou duas infeções urinárias nos 12 meses precedentes à colheita, encontrámos um grupo com 39 indivíduos de ambos os sexos dos 23 aos 88 anos, com diabéticos (4 casos), algaliados (3 casos) e acamados (1 caso). Pretendemos comparar esta população com a que apresenta infeção recorrente (3 ou mais infeções nos últimos 2 meses) e com a população de toda a amostra. Há uma considerável dispersão por várias estirpes que é muito semelhante à da população amostral (Gráfico 1.3).

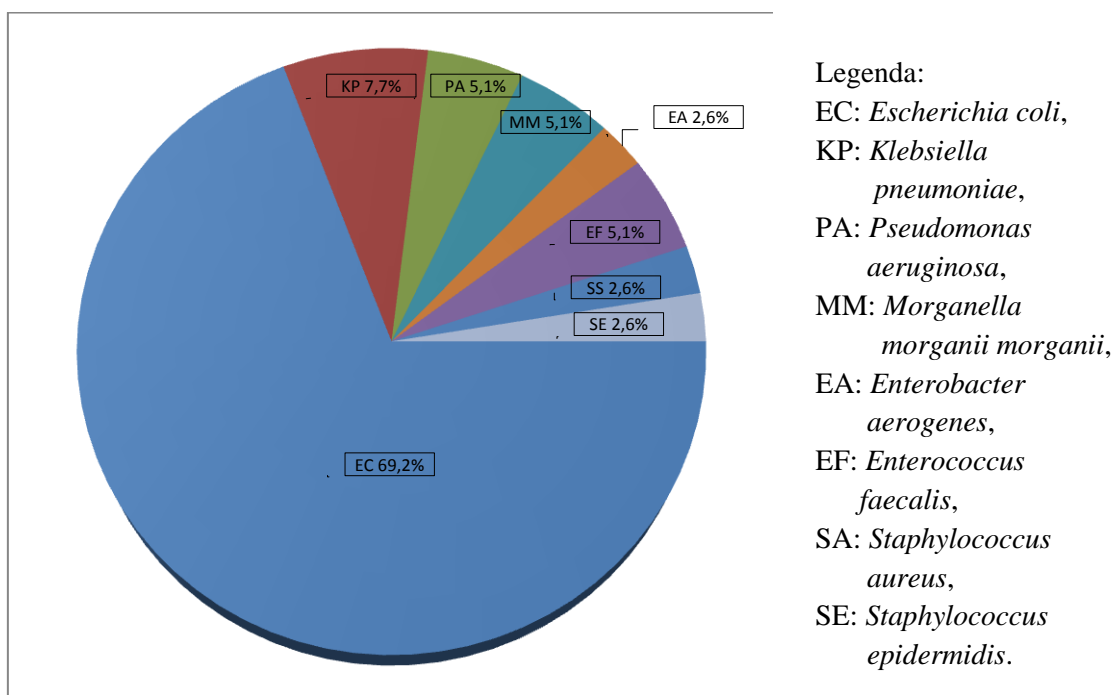
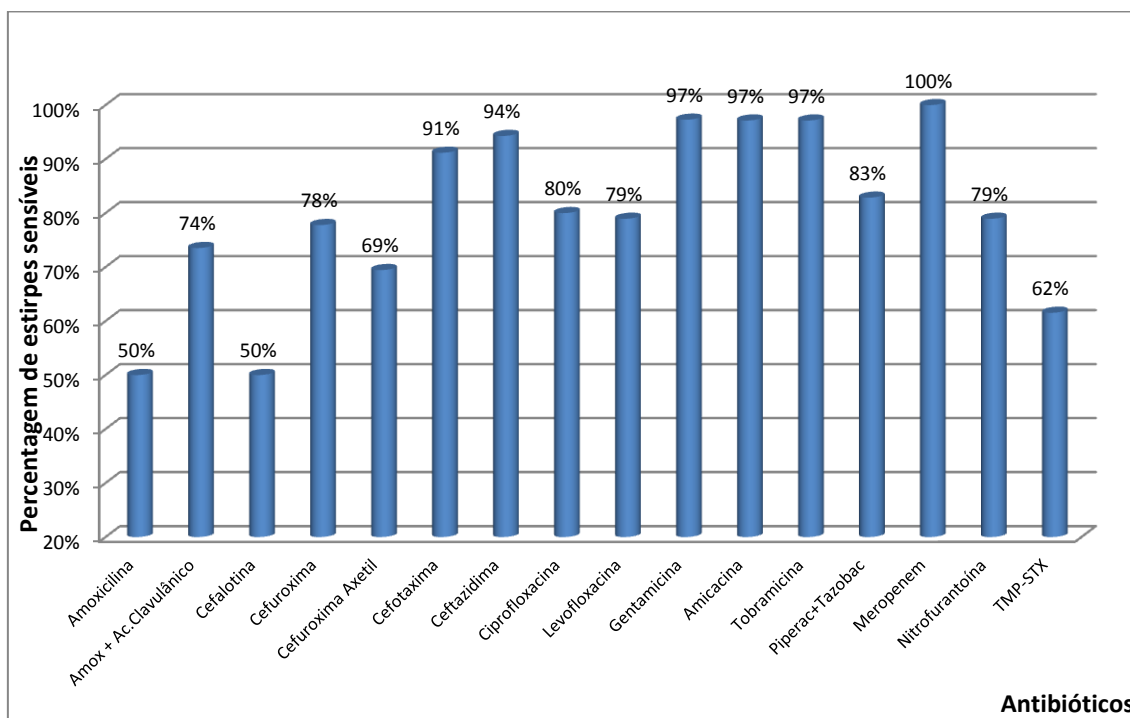


Gráfico 1.13 – Estirpes isoladas a partir de amostras de urina de indivíduos com infeção urinária e com histórico de uma ou duas infeções urinárias nos 12 meses precedentes à colheita.

Neste subgrupo, as opções possíveis para a terapêutica empírica podem ser a cefuroxima, a nitrofurantoína, as quinolonas ou as cefalosporinas de terceira geração.



	Amoxicilina	Amox + Ac.Clavulânico	Cefalotina	Cefuroxima	Cefuroxima Axetil	Cefotaxima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Gentamicina	Amicacina	Tobramicina	Piperac+Tazobac	Meropenem	Nitrofurantoína	TMP-STX
n.º de estirpes testadas	38	34	34	36	36	34	35	35	38	37	35	35	35	35	38	39
% de estirpes sensíveis	50%	74%	50%	78%	69%	91%	94%	80%	79%	97%	97%	97%	83%	100%	79%	62%

Gráfico 1.14 – Estirpes sensíveis no subgrupo dos utentes com histórico de uma ou duas infeções nos 12 meses precedentes à colheita, em valores percentuais. O número de estirpes testadas contra cada antibiótico é um indicador da representatividade do valor obtido. Estão omissos os antibióticos que são testados contra um grupo muito reduzido de estirpes (menos de metade das estirpes do subgrupo), dada a reduzida representatividade desse resultado com vista à terapêutica empírica. O trimetoprim-sulfametoxasole é testado contra todas as estirpes e assim indica a dimensão do subgrupo em análise.

Para melhor conhecermos a população e tentar identificar características específicas, filtrámos o subgrupo dos casos com três ou mais infeções de repetição nos 12 meses precedentes à colheita – a chamada infeção recorrente – que apresenta uma grande heterogeneidade de isolados, sendo composto por 31 indivíduos de ambos os sexos também entre 10 aos 88 anos.

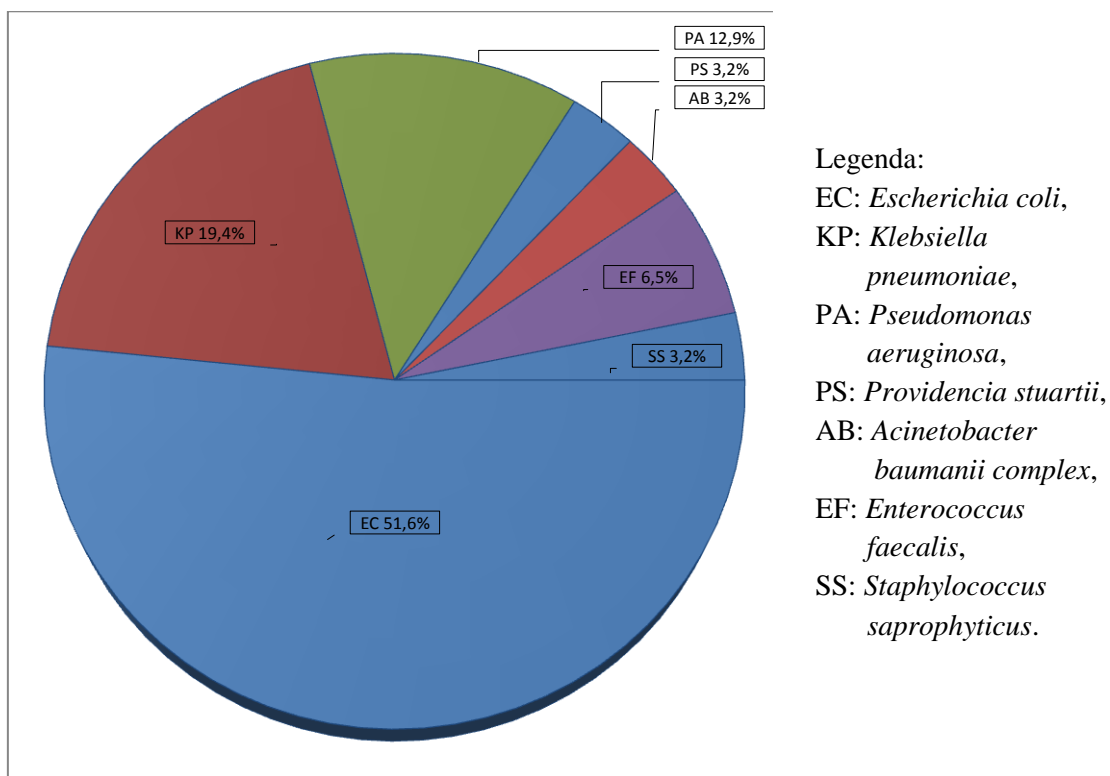
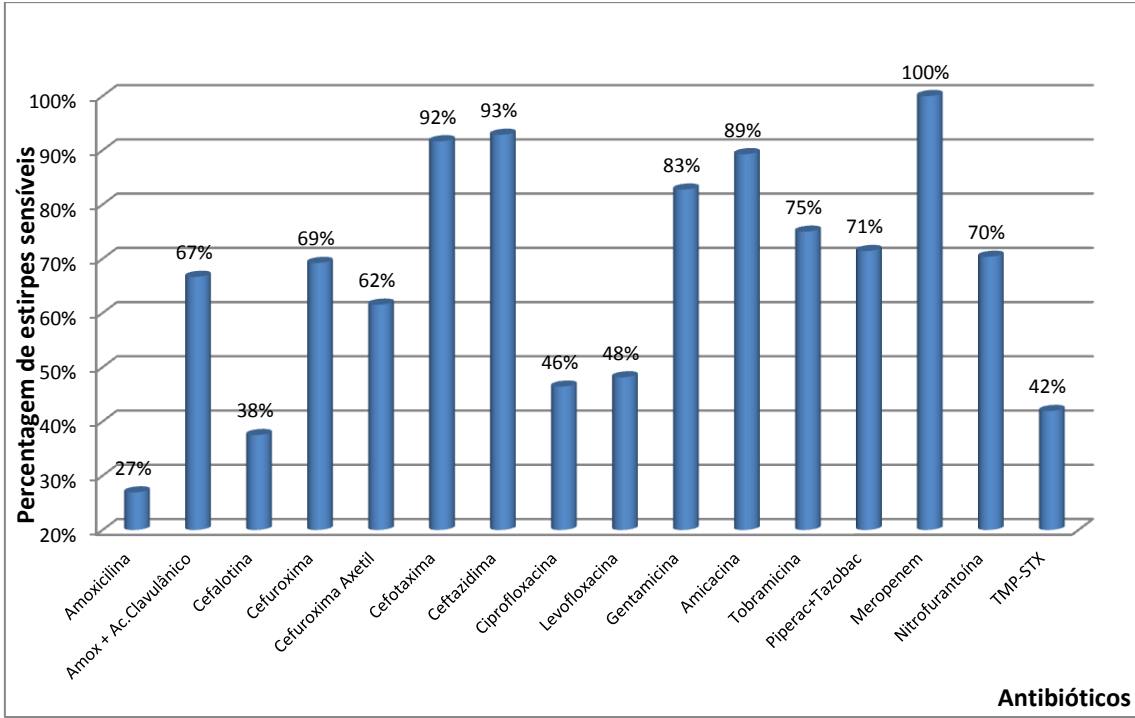


Gráfico 1.15 – Estirpes isoladas a partir de amostras de urina de indivíduos com infeção urinária e com histórico de três ou mais infeções urinárias nos 12 meses precedentes à colheita.

A comparação das estirpes isoladas de indivíduos com infeções de repetição e infeções recorrentes indica que apenas o grupo com 3 ou mais infeções nos 12 meses precedentes à colheita apresenta diferenças significativas para a população de toda a amostra. Neste grupo a prevalência de *Escherichia coli* é de 51,5% em confronto com os 71,7% na população em geral. Também as prevalências de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* são consideravelmente mais altas nesta subpopulação que na população de toda a amostra. Tratam-se de dois microrganismos com mecanismos de persistência como a cápsula e a produção de muco no caso de *Klebsiella* e o elevado número de resistências<sup>5</sup> e a capacidade de formar biofilmes<sup>6</sup> no caso de *Pseudomonas*.

Não é de excluir que alguns destes pacientes, sobretudo os mais velhos, possam estar imunologicamente debilitados. Por outro lado, as infeções de repetição provocam inflamação e lesões que predispoem para novas infeções<sup>7</sup>.

Neste subgrupo dos doentes com infeção recorrente, é de notar a elevada percentagem de resistências encontradas contra a cefalotina e contra o trimetoprim-sulfametoxasole, além da já previsível elevada taxa de resistências à amoxicilina. Estes resultados estão de acordo com o facto de ser tratar de um grupo muito sujeito à antibioterapia, pelo que a pressão seletiva para o aparecimento de resistências nos antibióticos de primeira linha é alta.



	Amoxicilina	Amox + Ac.Clavulânico	Cefalotina	Cefuroxima	Cefuroxima Axetil	Cefotaxima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Gentamicina	Amicacina	Tobramicina	Piperac+Tazobac	Meropenem	Nitrofurantoína	TMP-STX
n.º de estirpes testadas	26	24	24	26	26	24	28	28	27	29	28	28	28	27	27	31
% de estirpes sensíveis	27%	67%	38%	69%	62%	92%	93%	46%	48%	83%	89%	75%	71%	100%	70%	42%

Gráfico 1.16 – Estirpes sensíveis no subgrupo dos utentes com histórico de três ou mais infeções de repetição nos 12 meses precedentes à colheita, em valores percentuais. O número de estirpes testadas contra cada antibiótico é um indicador da representatividade do valor obtido. Estão omissos os antibióticos que são testados contra um grupo muito reduzido de estirpes (menos de metade das estirpes do subgrupo), dada a reduzida representatividade desse resultado com vista à terapêutica empírica. O trimetoprim-sulfametoxasole é testado contra todas as estirpes e assim indica a dimensão do subgrupo em análise.

O grupo dos utentes algaliados (13 casos, 20 isolados), inclui 4 dos 7 casos de *Pseudomonas aeruginosa* presentes na amostra, assim como o único caso de *Acinetobacter baumannii*. É também o grupo em que a representatividade de *Escherichia coli* é menor, o que corrobora a possibilidade de outras estirpes oportunistas encontrarem nestes casos um meio mais vulnerável para colonizar e formar biofilmes levando à infeção<sup>6</sup>.

A média de idades ronda os 73 anos, a percentagem de indivíduos do sexo masculino é mais alta do que no resto da amostragem com um rácio F/M de 1.6 e a percentagem de amostras com dois isolados está também bastante acima da média populacional com 54%. Neste grupo é particularmente ténue a fronteira entre contaminação e infeção, dadas as dificuldades da colheita em assepsia e a facilidade com que muitas estirpes formam biofilmes nas superfícies da algália.

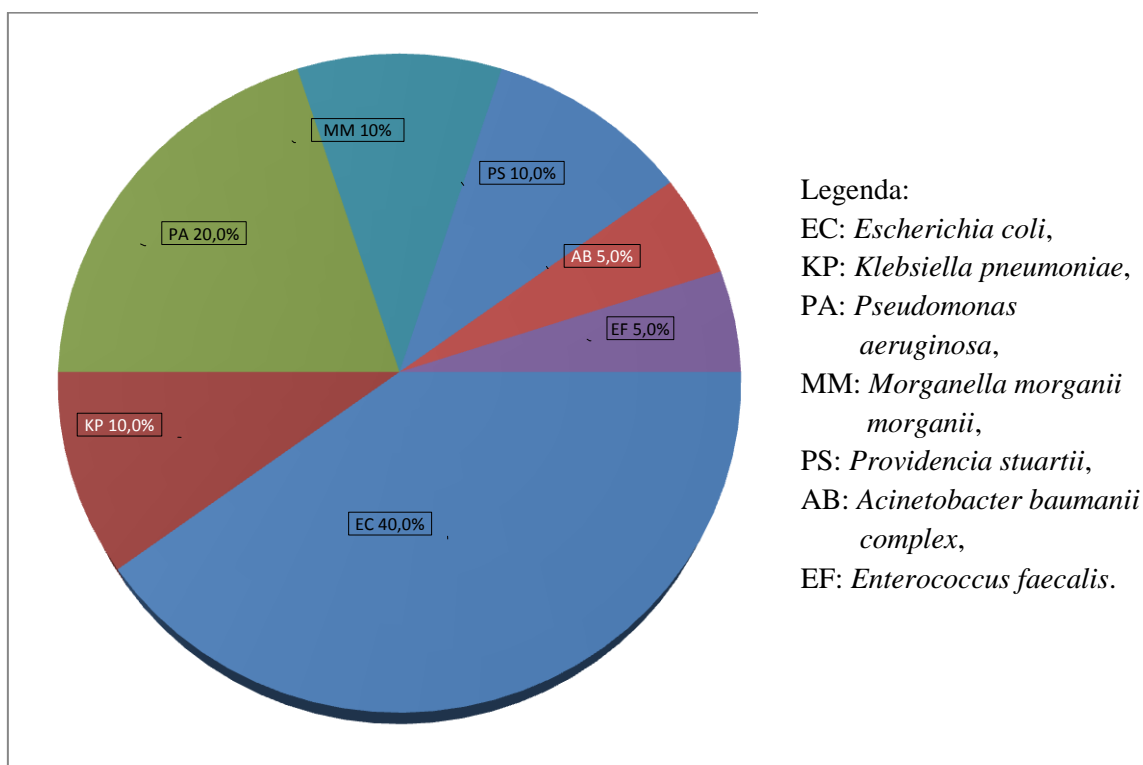
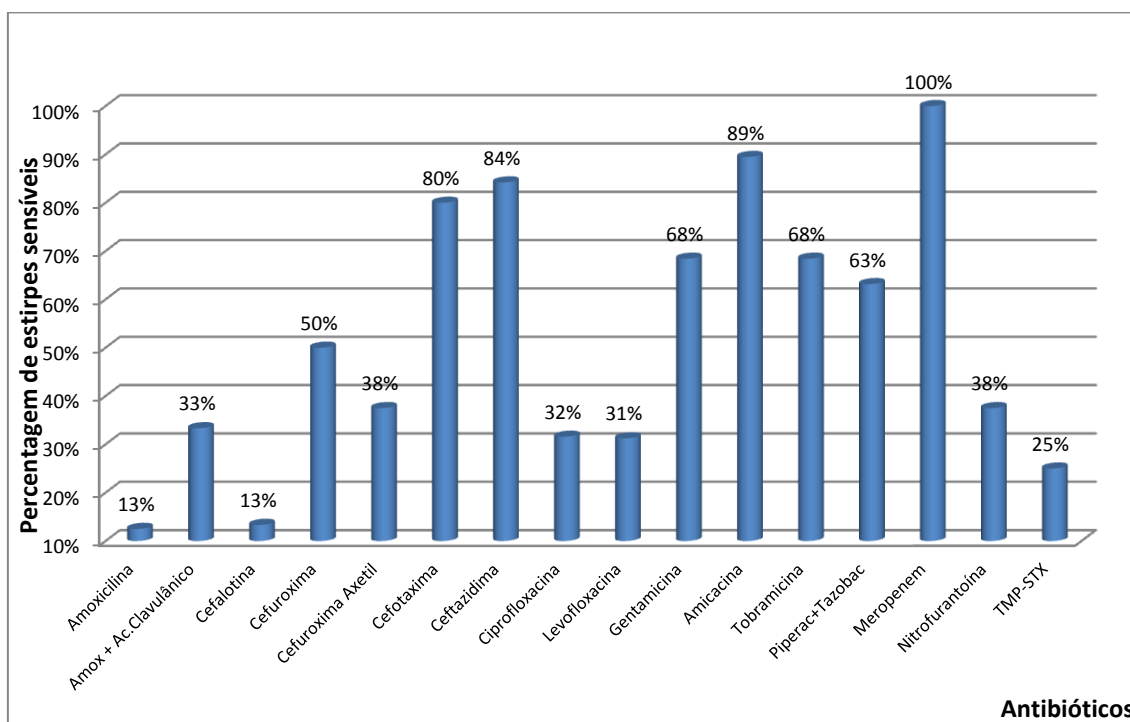


Gráfico 1.17 – Estirpes isoladas a partir de amostras de urina de indivíduos algaliados com infeção urinária.

O estudo dos perfis de resistência, revela que não é proponível uma terapêutica empírica com antibióticos de primeira linha. As percentagens de sensibilidade estão abaixo dos 50% para o trimetoprim-sulfametoxasole, nitrofurantoína e  $\beta$ -lactâmicos de primeira e segunda geração. Também as quinolonas com percentagens de sensibilidade a rondar os 30% não são opção. A opção são as cefalosporinas de terceira geração como a cefotaxima e a ceftazidima com percentagens de sensibilidade a rondar os 80%, embora as estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* sejam naturalmente resistentes à cefotaxima. Se houver alguma condição que impeça a utilização destes fármacos, a opção seguinte poderá ser um macrólido. O médico pode ainda ponderar a substituição da algália.



	Amoxicilina	Amox + Ac.Clavulânico	Cefalotina	Cefuroxima	Cefuroxima Axetil	Cefotaxima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Gentamicina	Amicacina	Tobramicina	Piperac+Tazobac	Meropenem	Nitrofurantoína	TMP-STX
n.º de estirpes testadas	16	15	15	16	16	15	19	19	16	19	19	19	19	18	16	20
% de estirpes sensíveis	13%	33%	13%	50%	38%	80%	84%	32%	31%	68%	89%	68%	63%	100%	38%	25%

Gráfico 1.18 – Estirpes sensíveis no subgrupo utentes algaliados, em valores percentuais. O número de estirpes testadas contra cada antibiótico é um indicador da representatividade do valor obtido. Estão omissos os antibióticos que são testados contra um grupo muito reduzido de estirpes (menos de metade das estirpes do subgrupo), dada a reduzida representatividade desse resultado com vista à terapêutica empírica. O trimetoprim-sulfametoxasole é testado contra todas as estirpes e assim indica a dimensão do subgrupo em análise.

O grupo dos acamados (7 casos, 11 isolados) é nesta amostra em tudo muito semelhante ao dos algaliados. Encontram-se neste grupo os dois casos de *Providencia stuartii* existentes nesta população assim como o caso de *Acinetobacter baumannii* que também pertence ao grupo anterior dos algaliados.

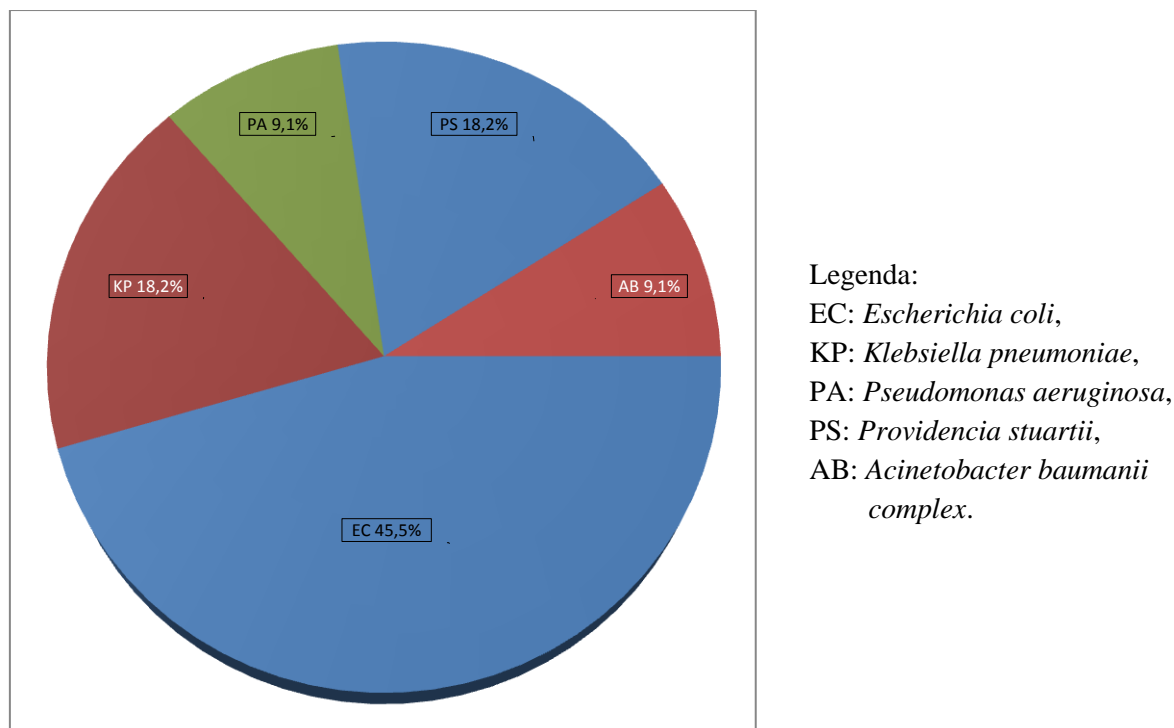
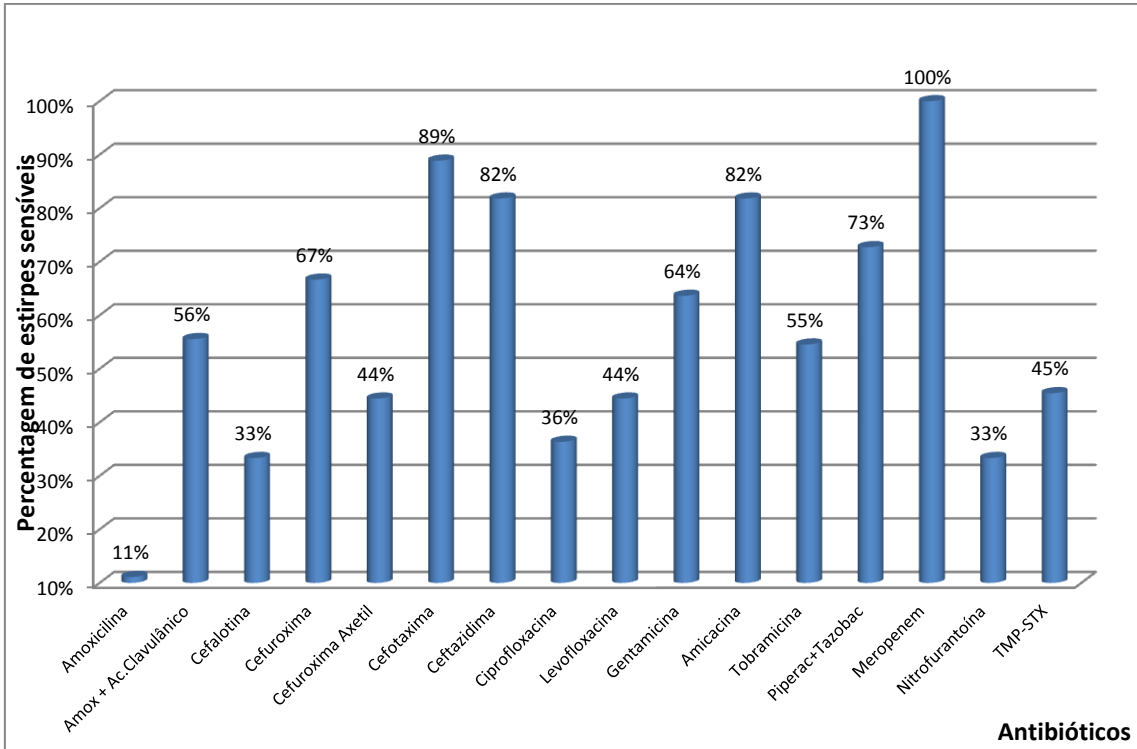


Gráfico 1.19 – Estirpes isoladas a partir de amostras de urina de indivíduos acamados com infecção urinária.

O número de acamados nesta amostragem é reduzido para extrapolar para outras populações. A idade média é de 69 anos (se se excluísse um doente com 15 anos, a média de idades seria de 78 anos) e é notório o equilíbrio entre ambos os sexos, com um rácio F/M de 1,3 e a elevada frequência de amostras com dois isolados de 57%. Neste grupo de acamados, a infecção é causada unicamente por bactérias de gram negativo. Há ainda a observar que os dois casos de *Providencia stuartii* presentes na amostra são de dois utentes com amostras com dois isolados, ambos acamados e algaliados.



Os perfis de resistência são muito semelhantes aos do subgrupo anterior, havendo só a notar a maior percentagem de sensibilidade à associação amoxicilina + ácido clavulânico, (56%) e à Cefuroxima (67%), o que no entanto, não é suficiente para alterar as opções terapêuticas acima descritas.



	Amoxicilina	Amox + Ac.Clavulânico	Cefalotina	Cefuroxima	Cefuroxima Axetil	Cefotaxima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Gentamicina	Amicacina	Tobramicina	Piperac+ Tazobac	Meropenem	Nitrofurantoina	TMP-STX
n.º de estirpes testadas	9	9	9	9	9	9	11	11	9	11	11	11	11	10	9	11
% de estirpes sensíveis	11%	56%	33%	67%	44%	89%	82%	36%	44%	64%	82%	55%	73%	100%	33%	45%

Gráfico 1.20 – Estirpes sensíveis no subgrupo utentes acamados, em valores percentuais. O número de estirpes testadas contra cada antibiótico é um indicador da representatividade do valor obtido. Estão omissos os antibióticos que são testados contra um grupo muito reduzido de estirpes (menos de metade das estirpes do subgrupo), dada a reduzida representatividade desse resultado com vista à terapêutica empírica. O trimetoprim-sulfametoxasole é testado contra todas as estirpes e assim indica a dimensão do subgrupo em análise.

A amostra de diabéticos (19 casos, 23 isolados) apresenta uma frequência de *Escherichia coli* mais próxima da da população geral, inclui 3 dos 7 casos de *Pseudomonas aeruginosa*, e o único caso de *Morganella morganii morganii*, Tal como nos dois grupos anteriores, o único caso da amostra com *Acinetobacter baumannii* está presente, dado que além de algaliado e acamado, é também diabético.

Em média 90% dos diabéticos na população são do tipo 2, que é de manifestação tardia, depois da 4ª década de vida<sup>8</sup>. Assim a média de idades nesta subpopulação ronda os 74 anos e é mais alta que a média total da amostra. O rácio F/M é de 2,8 o que está abaixo da média amostral. A percentagem de amostras com dois isolados ronda os 21% neste sub-grupo, valor mais alto que a população total.

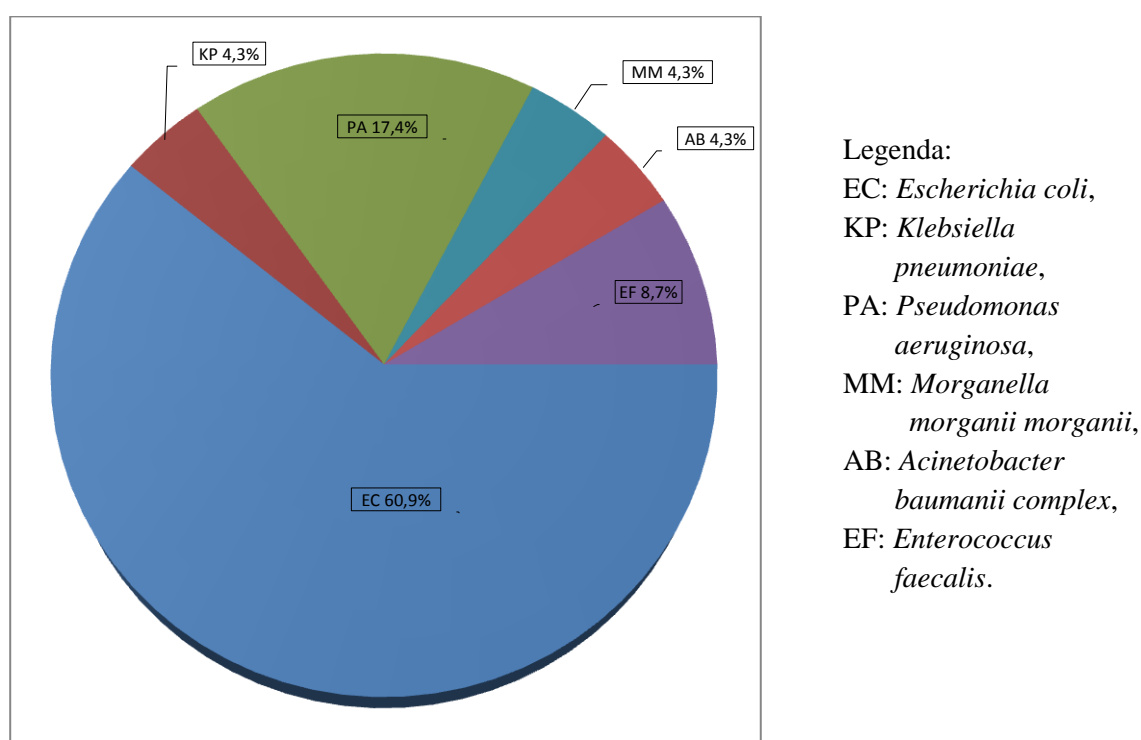
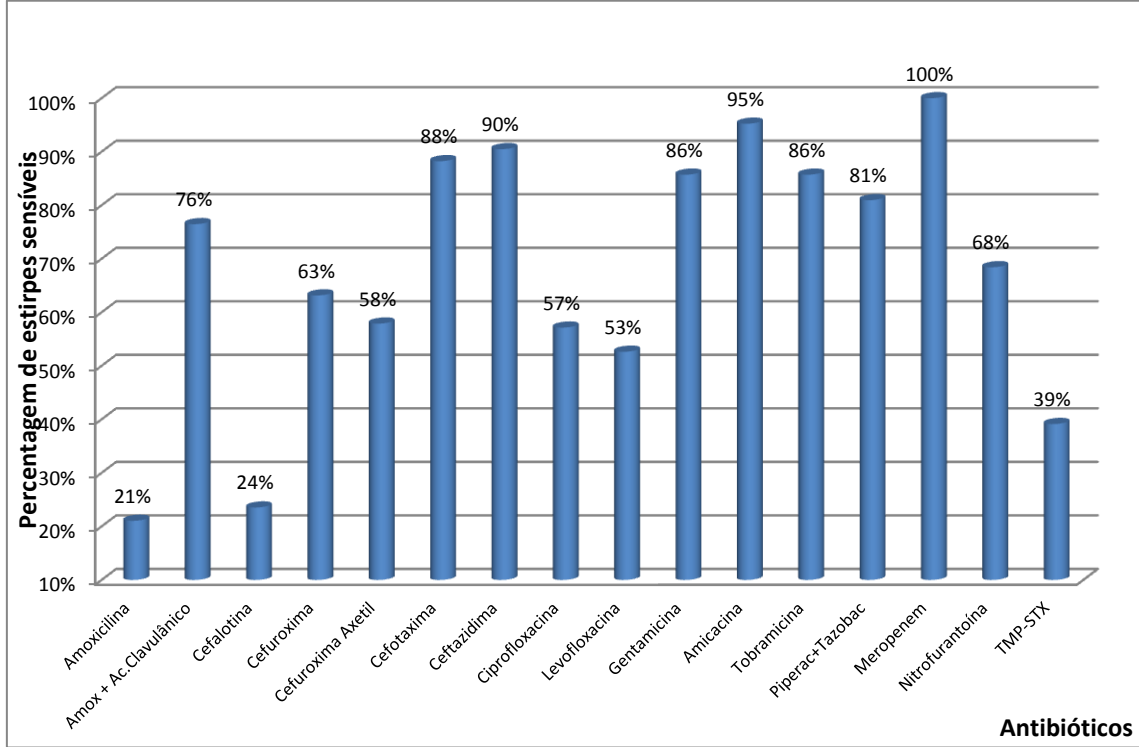


Gráfico 1.21 – Estirpes isoladas a partir de amostras de urina de indivíduos diabéticos com infeção urinária.

Tabela 1.6 – Quadro resumo dos dados demográficos das sub-populações dos três grupos de risco (algaliados, acamados e diabéticos) em confronto com a população total da amostra.

	Total de casos	Média de idades	Rácio F/M	amostras com dois isolados	% amostras com dois isolados
Amostra	141	53,4	6,1	11	8%
Diabéticos	19	73,9	2,8	4	21%
Acamados	7	69,0	1,3	4	57%
Algaliados	13	73,2	1,6	7	54%

Embora com maiores percentagens de sensibilidade a alguns antibióticos do que nos dois grupos anteriores, associação amoxicilina + ácido clavulânico com 76% de sensibilidade e nitrofurantoína com 68% de sensibilidade, as opções terapêuticas não podem ser muito diferentes das acima apresentadas, embora a erradicação da infecção urinária no diabético exija tratamentos longos de entre 7 a 14 dias<sup>9</sup>. As estirpes do género *Pseudomonas* presentes contribuem para a elevada frequência de resistência ao trimetoprim-sulfametoxasole.



	Amoxicilina	Amox + Ac.Clavulânico	Cefalotina	Cefuroxima	Cefuroxima Axetil	Cefotaxima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Gentamicina	Amicacina	Tobramicina	Piperac+Tazobac	Meropenem	Nitrofurantoína	TMP-STX
n.º de estirpes testadas	19	17	17	19	19	17	21	21	19	21	21	21	21	20	19	23
% de estirpes sensíveis	21%	76%	24%	63%	58%	88%	90%	57%	53%	86%	95%	86%	81%	100%	68%	39%

Gráfico 1.22 – Estirpes sensíveis no subgrupo utentes diabéticos, em valores percentuais. O número de estirpes testadas contra cada antibiótico é um indicador da representatividade do valor obtido. Estão omissos os antibióticos que são testados contra um grupo muito reduzido de estirpes (menos de metade das estirpes do subgrupo), dada a reduzida representatividade desse resultado com vista à terapêutica empírica. O trimetoprim-sulfametoxasole é testado contra todas as estirpes e assim indica a dimensão do subgrupo em análise.

Nesta amostragem, filtrando todos os casos com idade igual ou superior a 65 anos, de ambos os sexos, obtemos um grupo com 58 casos e 69 isolados em que reunimos todos os idosos. Deste grupo fazem parte membros de outros grupos de risco, como acamados, algaliados e diabéticos. A heterogeneidade deste grupo é manifesta na variedade de estirpes que causam infeção. Estão neste grupo 6 dos 7 casos de *Pseudomonas aeruginosa*, os 3 casos de *Morganella morganii morganii*, os 2 casos de *Providencia stuartii*, o caso de *Acinetobacter baumannii complex*, o caso de *Citrobacter freudii* e o caso de *Staphylococcus aureus*.

Neste universo, 48 casos são do sexo feminino e 10 do sexo masculino, o que resulta num rácio F/M de 4,8. A percentagem de amostras com dois isolados ronda os 19%, com 11 casos, mas destes 6 são do sexo feminino e 5 do sexo masculino (rácio F/M de 1,2).

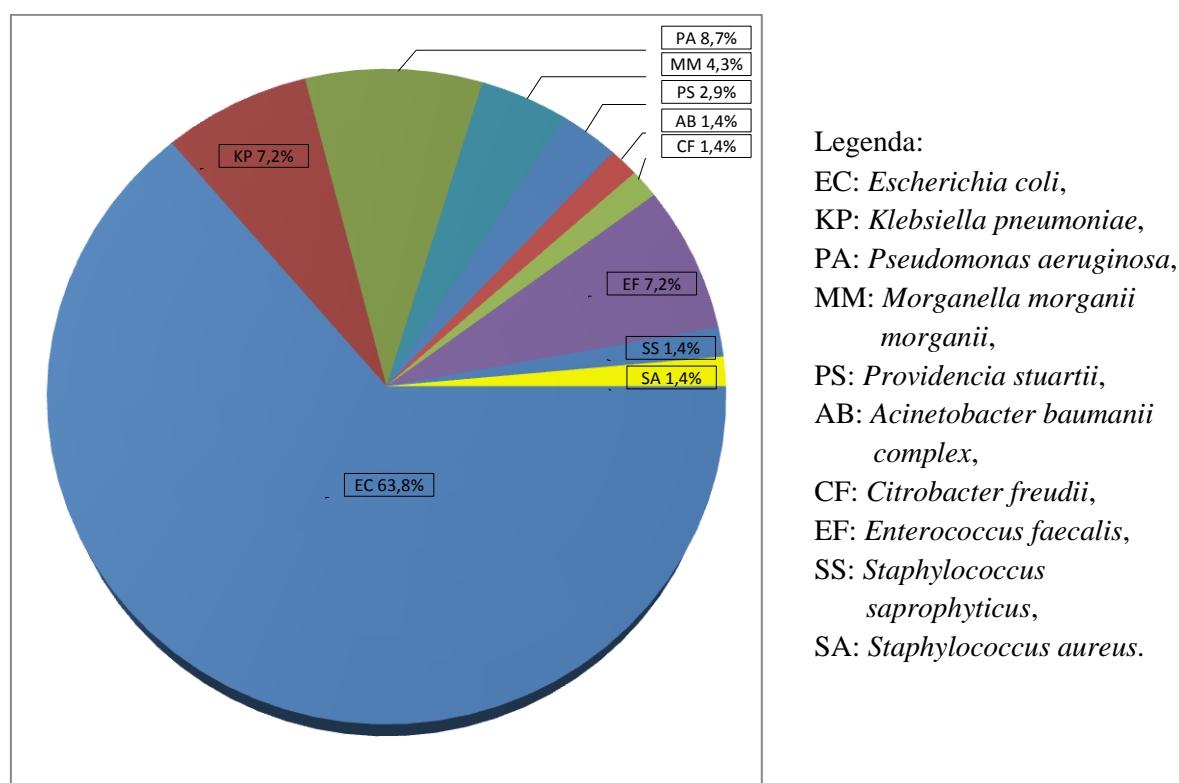
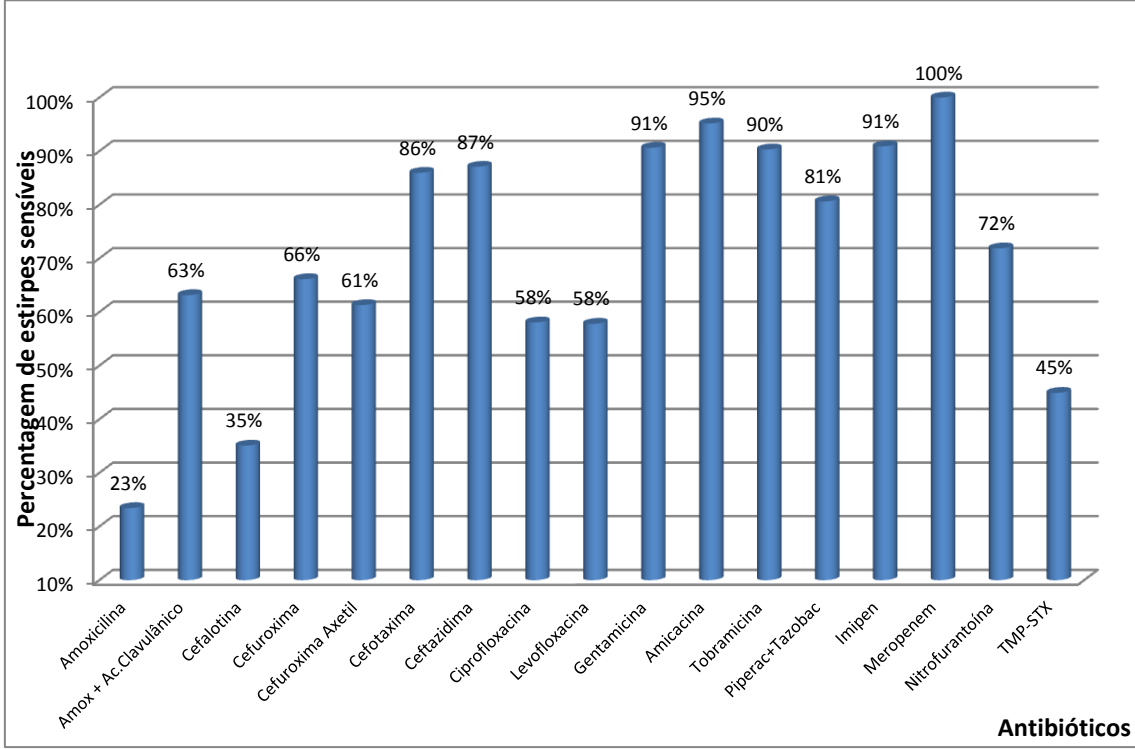


Gráfico 1.23 – Estirpes isoladas a partir de amostras de urina de indivíduos com idade maior ou igual a 65 anos e com infeção urinária.

Estão presentes todos os 7 casos de  $\beta$ -lactamase de espectro alargado da amostra (5 deles presentes em isolados de *Escherichia coli* e 2 deles em isolados de *Klebsiella pneumoniae*), o que por si indica que é uma população muito sujeita a antibioterapia e com maior probabilidade de apresentar resistências. Neste grupo, tal como nos anteriores nenhum antibiótico de primeira linha é seguro e é necessário recorrer às

cefalosporinas de terceira geração, cefotaxima e ceftazidima respetivamente com 86% e 87% de sensibilidade.

A presença dos isolados dos géneros *Pseudomonas*, *Morganella* e *Acinetobacter* contribui para a elevada percentagem de resistências contra os  $\beta$ -lactâmicos, trimetoprim-sulfametoxasole e nitrofurantoína.



	Amoxicilina	Amox + Ac.Clavulânico	Cefalotina	Cefuroxima	Cefuroxima Axetil	Cefotaxima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Gentamicina	Amicacina	Tobramicina	Piperac + Tazobac	Meropenem	Nitrofurantoína	TMP-STX
n.º de estirpes testadas	64	57	57	62	62	57	62	62	64	64	62	62	62	61	64	69
% de estirpes sensíveis	23%	63%	35%	66%	61%	86%	87%	58%	58%	91%	95%	90%	81%	100%	72%	45%

Gráfico 1.24 – Estirpes sensíveis no subgrupo utentes com idade igual ou superior a 65 anos, em valores percentuais. O número de estirpes testadas contra cada antibiótico é um indicador da representatividade do valor obtido. Estão omissos os antibióticos que são testados contra um grupo muito reduzido de estirpes (menos de metade das estirpes do subgrupo), dada a reduzida representatividade desse resultado com vista à terapêutica empírica. O trimetoprim-sulfametoxasole é testado contra todas as estirpes e assim indica a dimensão do subgrupo em análise.

Se ao grupo anterior retirarmos todos os casos com os seguintes fatores de risco: algaliação, doença diabética e estar acamado, obtemos um subgrupo composto por 31 casos e 33 amostras.

Neste grupo é notória a maior frequência de *Escherichia coli* relativamente às outras estirpes. O rácio F/M é de 5,2 um valor já muito próximo do valor amostral. A percentagem de amostras com dois isolados é baixa, de apenas 6%, mas curiosamente os 2 casos existentes estão presentes em indivíduos do sexo masculino.

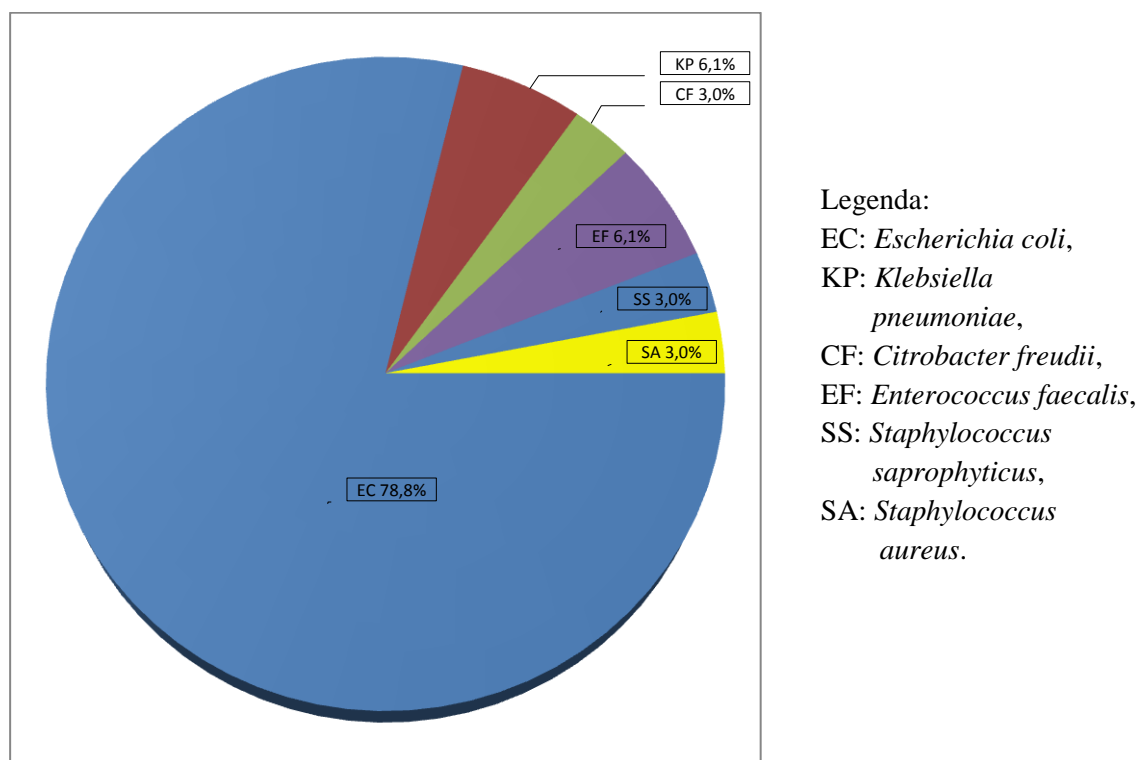
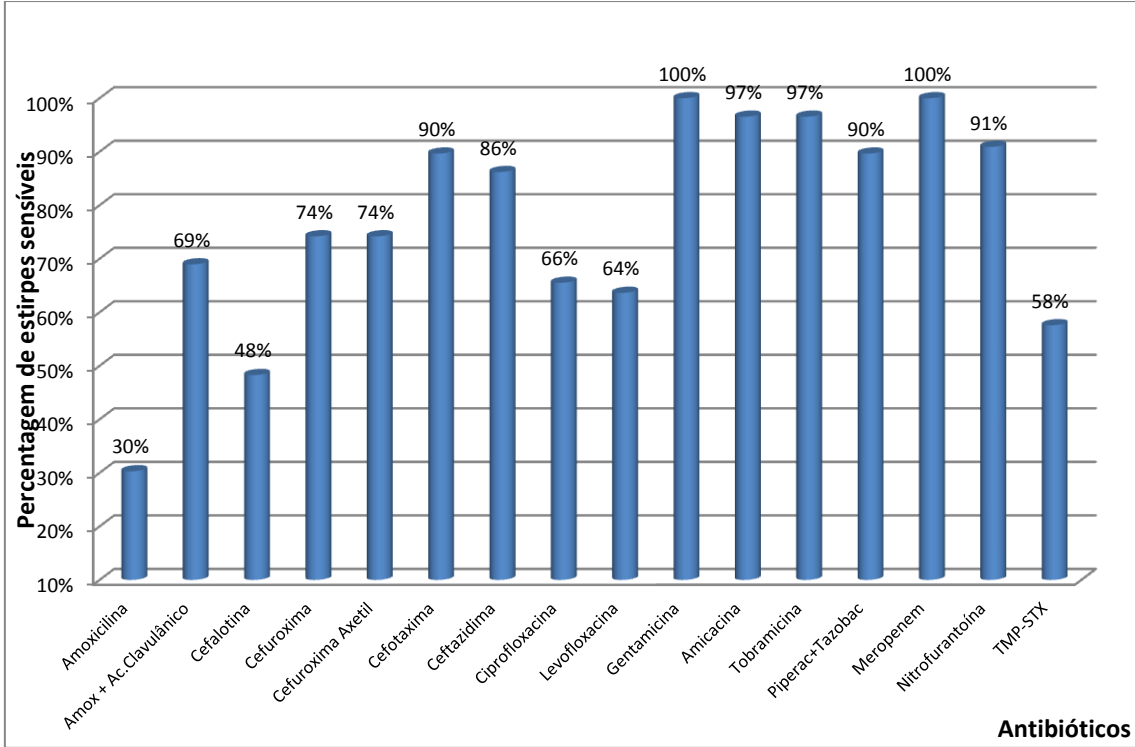


Gráfico 1.25 – Estirpes isoladas a partir de amostras de urina do subgrupo de indivíduos com idade maior ou igual a 65 anos, com infeção urinária e sem fatores de risco como algaliação, doença diabética e estar acamado.

Tal como nos grupos anteriores estão presentes elevadas percentagens de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos de primeira e segunda geração e em que as cefalosporinas são opção, cefotaxima e ceftazidima respetivamente com 90% e 86% de sensibilidade, mas em que também a nitrofurantoína apresenta uma percentagem de sensibilidade de 91%.



	Amoxicilina	Amox + Ac.Clavulânico	Cefalotina	Cefuroxima	Cefuroxima Axetil	Cefotaxima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Gentamicina	Amicacina	Tobramicina	Piperac+Tazobac	Meropenem	Nitrofurantoína	TMP-STX
n.º de estirpes testadas	33	29	29	31	31	29	29	29	33	31	29	29	29	29	33	33
% de estirpes sensíveis	30%	69%	48%	74%	74%	90%	86%	66%	64%	100%	97%	97%	90%	100%	91%	58%

Gráfico 1.26 – Estirpes sensíveis no subgrupo de utentes com idade igual ou superior a 65 anos em valores percentuais, excluindo os portadores de fatores de risco. O número de estirpes testadas contra cada antibiótico é um indicador da representatividade do valor obtido. Estão omissos os antibióticos que são testados contra um grupo muito reduzido de estirpes (menos de metade das estirpes do subgrupo), dada a reduzida representatividade desse resultado com vista à terapêutica empírica. O trimetoprim-sulfametoxazole é testado contra todas as estirpes e assim indica a dimensão do subgrupo em análise.

Se à amostra filtrarmos todos os casos de crianças e jovens abaixo dos 20 anos de ambos os sexos, obtemos um grupo de 12 casos. Nesta amostra estão presentes 4 dos 5 casos de *Proteus mirabilis* (o 5º caso está presente numa mulher de 21 anos). A estirpe *Klebsiella pneumoniae*, presente na amostra geral em 7,2% dos casos e presente em quase todos os grupos de risco, não está presente nem neste grupo de crianças e jovens nem no grupo das grávidas.

São apenas 2 os indivíduos do sexo masculino neste sub-grupo e situam-se ambos na idade pediátrica um com 9 meses e outro com 3 anos. O rácio F/M é 6,0 e não foram registadas infeções com dois isolados.

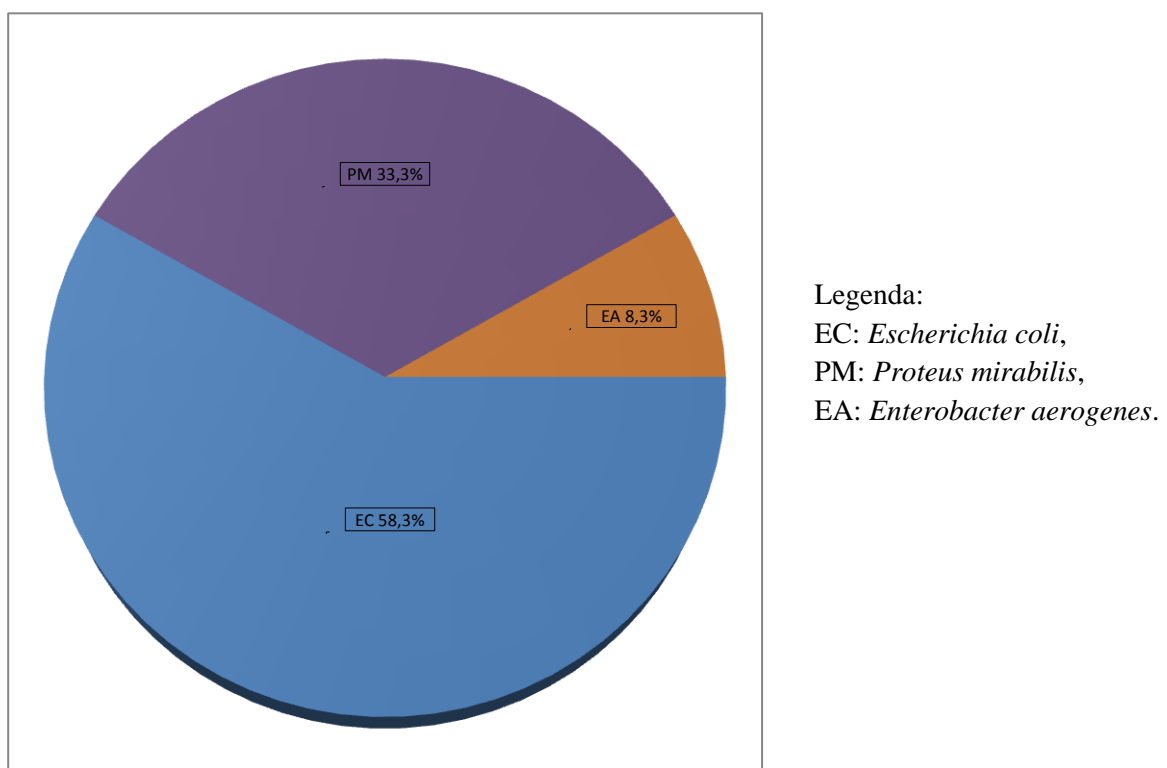
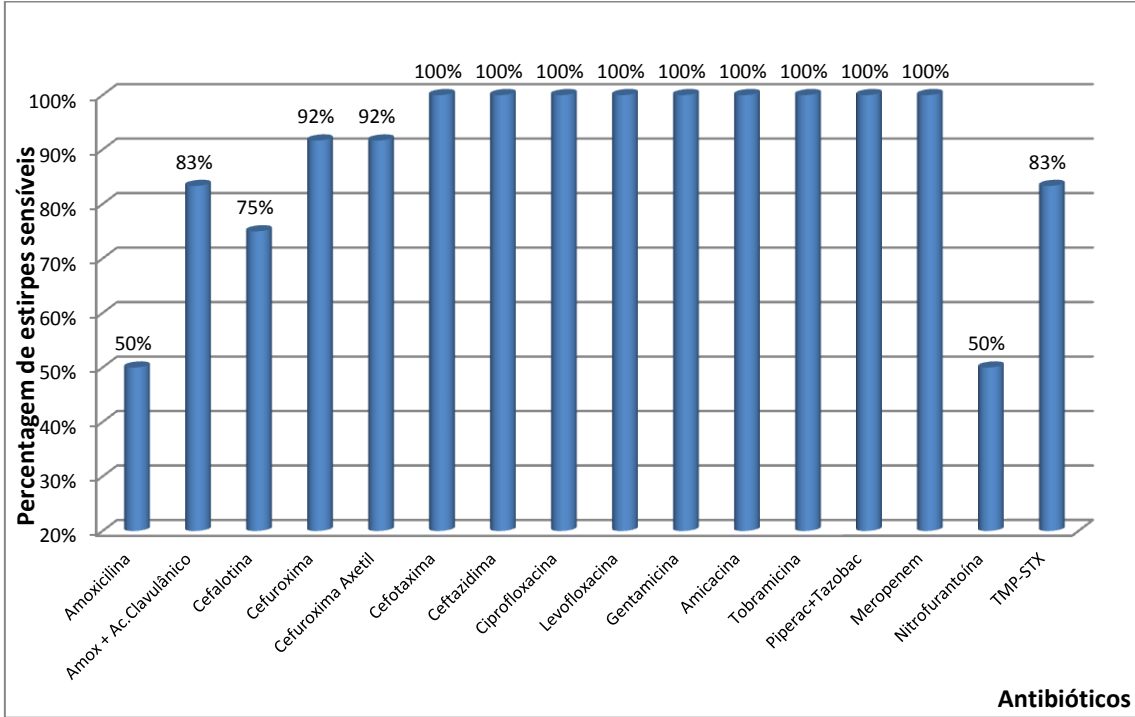


Gráfico 1.27 – Estirpes isoladas a partir de amostras de urina de crianças e jovens com idade inferior a 20 anos e com infeção urinária.



Neste subgrupo a associação amoxicilina + ácido clavulânico, cefalosporina de segunda geração e trimetoprim + sulfametoxasole, são opções terapêuticas com respetivamente 83%, 92% e 83% de percentagem de sensibilidade. O facto de as estirpes presentes além de *Escherichia coli* não terem geralmente muitas resistências manifesta-se nos perfis de resistência do Gráfico 1.28. A presença de isolados de *Proteus mirabilis* em 33% das amostras contribui para a elevada percentagem de resistência à nitrofurantoína.



	Amoxicilina	Amox + Ac.Clavulânico	Cefalotina	Cefuroxima	Cefuroxima Axetil	Cefotaxima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Gentamicina	Amicacina	Tobramicina	Piperac+Tazobac	Meropenem	Nitrofurantoína	TMP-STX
n.º de estirpes testadas	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
% de estirpes sensíveis	50%	83%	75%	92%	92%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	50%	83%

Gráfico 1.28 – Estirpes sensíveis no subgrupo de crianças e jovens até aos 19 anos em valores percentuais. Neste subgrupo todos os antibióticos são testados contra todas as estirpes.

Se filtrarmos todos os casos de homens entre os 20 e os 64 anos, sem os três fatores de risco (estar acamado, algaliado e ser portador de doença diabética), obtemos uma pequena população de 4 casos em que as estirpes presentes são *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

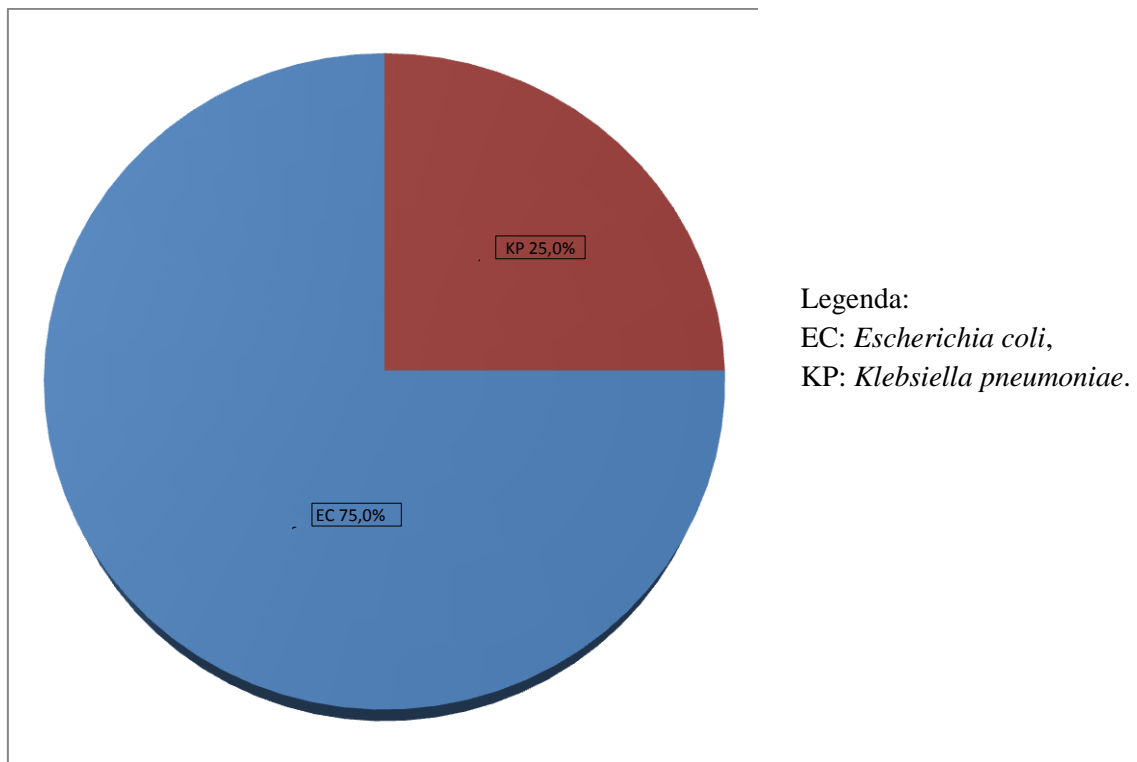
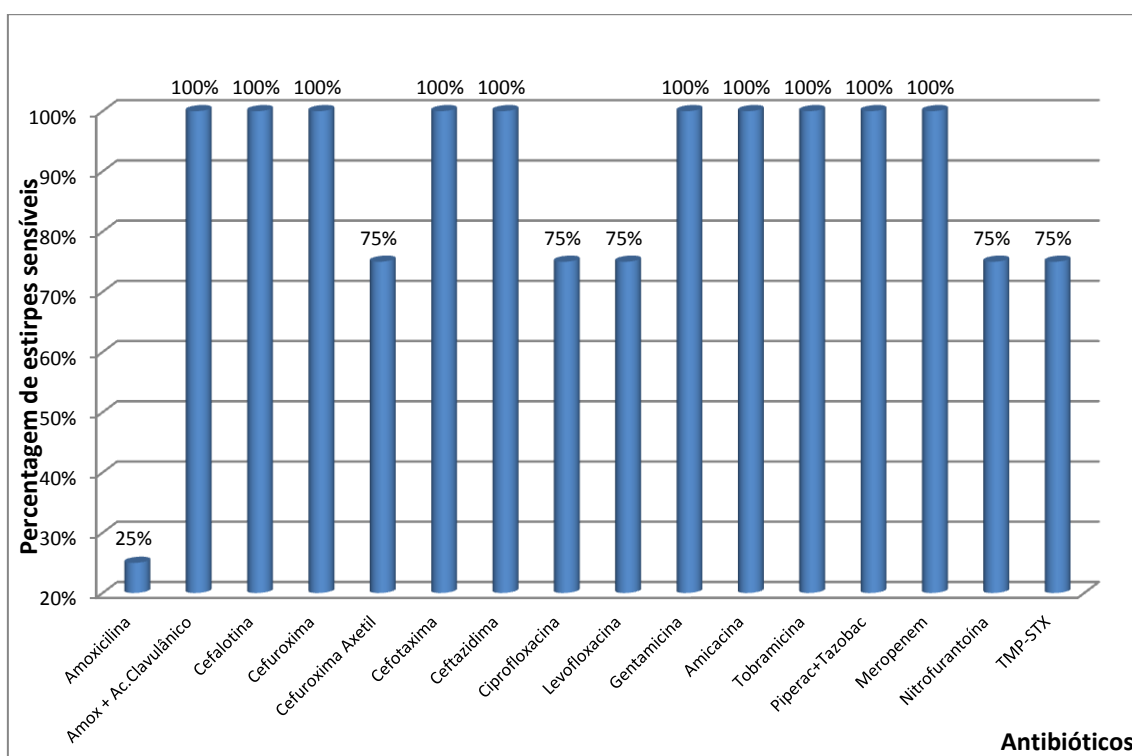


Gráfico 1.29 – Estirpes isoladas a partir de amostras de homens entre os 20 e os 64 anos, sem os três fatores de risco (estar acamado, algaliado e ser portador de doença diabética) e com infecção urinária.

A sensibilidade às cefalosporinas de primeira geração e seguintes assim como à associação amoxicilina + ácido clavulânico é de 100%. Só uma amostragem maior poderá validar estes dados assim como uma possibilidade de utilizar outros antibióticos de primeira linha nestes utentes, como o trimetoprim-sulfametoxasole e a nitrofurantoína.



	Amoxicilina	Amox + Ac.Clavulânico	Cefalotina	Cefuroxima	Cefuroxima Axetil	Cefotaxima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Gentamicina	Amicacina	Tobramicina	Piperac+Tazobac	Meropenem	Nitrofurantoina	TMP-STX
n.º de estirpes testadas	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
% de estirpes sensíveis	25%	100%	100%	100%	75%	100%	100%	75%	75%	100%	100%	100%	100%	100%	75%	75%

Gráfico 1.30 – Estirpes sensíveis no subgrupo de homens entre os 20 e os 64 anos em valores percentuais. Neste subgrupo todos os antibióticos são testados contra todas as estirpes.

No grupo das mulheres entre os 50 e os 64 anos, excluindo os três fatores de risco (estar acamado, algaliado e ser portador de doença diabética), obtemos uma população com 15 casos. As estirpes envolvidas são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*.

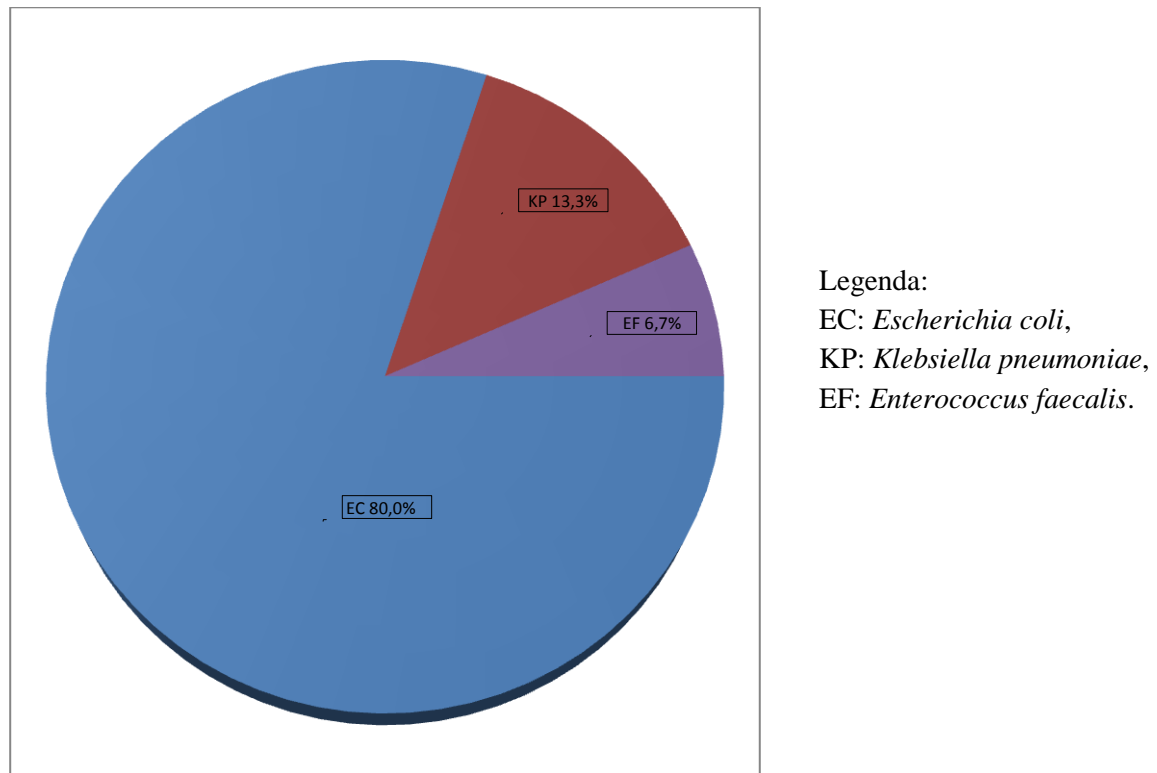
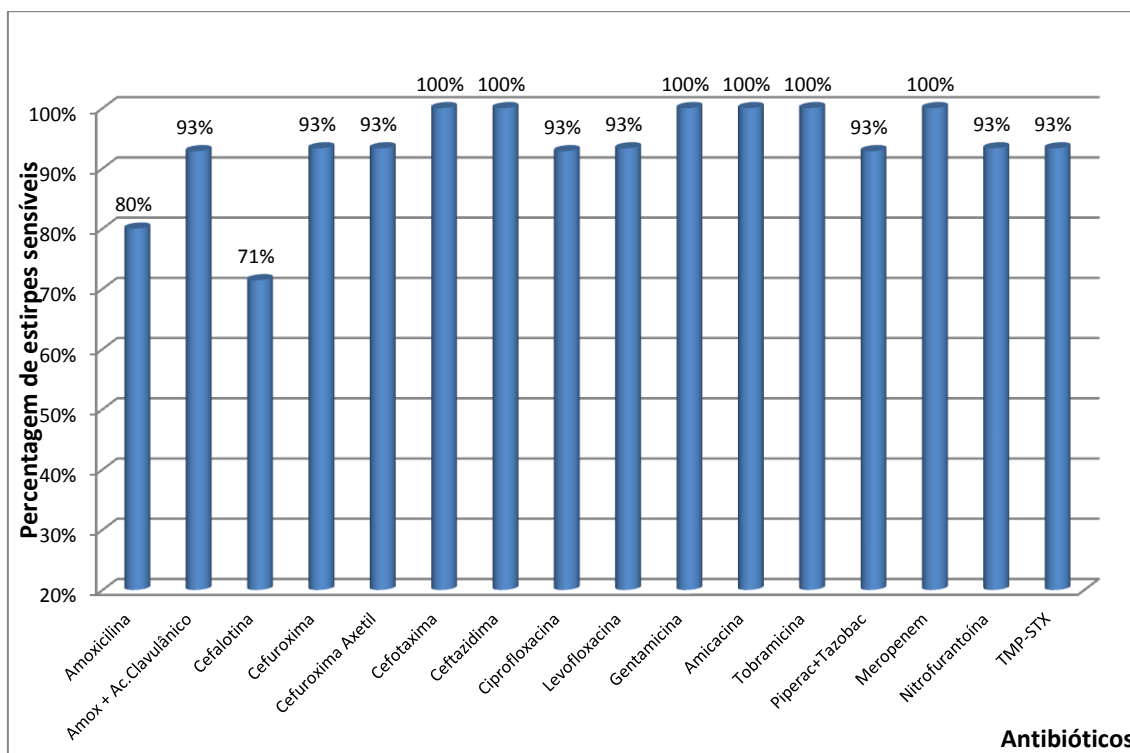


Gráfico 1.31 – Estirpes isoladas a partir de amostras de mulheres entre os 50 e os 64 anos, sem os três fatores de risco (estar acamado, algaliado e ser portador de doença diabética) e com infecção urinária.

Neste grupo a sensibilidade à amoxicilina, à associação amoxicilina + ácido clavulânico, e à cefuroxima são de respetivamente 80%, 93% e 93%. Também a nitrofurantoína e o trimetoprim-sulfametoxasole têm ambas percentagens de sensibilidade de 93%. Nota-se também neste grupo a menor percentagem de sensibilidade à cefalotina, que resulta certamente da sua utilização frequente e da consequente pressão seletiva.



	Amoxicilina	Amox + Ac.Clavulânico	Cefalotina	Cefuroxima	Cefuroxima Axetil	Cefotaxima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Gentamicina	Amicacina	Tobramicina	Piperac+Tazobac	Meropenem	Nitrofurantoína	TMP-STX
n.º de estirpes testadas	15	14	14	15	15	14	14	14	15	14	14	14	14	14	15	15
% de estirpes sensíveis	80%	93%	71%	93%	93%	100%	100%	93%	93%	100%	100%	100%	93%	100%	93%	93%

Gráfico 1.32 – Estirpes sensíveis no subgrupo de mulheres entre os 50 e os 64 anos em valores percentuais. O número de estirpes testadas contra cada antibiótico é um indicador da representatividade do valor obtido. Estão omissos os antibióticos que são testados contra um grupo muito reduzido de estirpes (menos de metade das estirpes do subgrupo), dada a reduzida representatividade desse resultado com vista à terapêutica empírica. O trimetoprim-sulfametoxasole é testado contra todas as estirpes e assim indica a dimensão do subgrupo em análise.

Em todos os casos sobretudo nos grupos de maior risco como idosos, diabéticos, acamados e algaliados, deve ser ponderado o custo benefício da terapêutica empírica versus a terapêutica dirigida após resultados de urocultura. Esta última inicia-se com um atraso de 1 ou 2 dias relativamente à primeira, mas tem menor risco de insucesso terapêutico e de gerar novas resistências aos antibióticos na comunidade.

## Conclusões

A leucocitúria e a hematúria são condições frequentes mas não obrigatórias na infecção urinária.

Com a segmentação da população e a estratificação do risco, foi possível identificar grupos distintos quer nas estirpes envolvidas na patogénese, quer na sua suscetibilidade aos antibióticos.

Com os resultados obtidos é possível dar ao clínico indicações úteis sobre quais os antibióticos prescrever e quais os antibióticos evitar no tratamento dos membros de um ou outro grupo de risco na população estudada.

Os resultados obtidos na identificação das estirpes estão de acordo com que está descrito na literatura com os prevalências de *Escherichia coli* a rondar os 80% na infecção não complicada da mulher jovem e a descer para os 60% nos casos de infecção no idoso e institucionalizado<sup>2, 10</sup>.

Na mulher jovem a prevalência de *Escherichia coli* é alta, mas com o aumento da idade e dos fatores de risco para infecção urinária (algáliação, diabetes, etc), esta estirpe vai gradualmente dando lugar a outras estirpes oportunistas.

Na infecção recorrente a população bacteriana apresenta mais resistências.

Nos doentes mais sujeitos a antibioterapia (doentes recorrentes e idosos) as estirpes isoladas apresentam mais resistências, e em alguns grupos a terapêutica empírica comporta maiores riscos de insucesso terapêutico.

Os antibióticos de primeira linha utilizados no tratamento da infecção urinária num dado grupo de risco são também os que encontram mais resistências na população bacteriana ao fim de algum tempo.

## Crítica

O estudo foi realizado a partir de dados obtidos na rotina e por esse motivo os resultados estão limitados aos antibiogramas realizados por rotina a cada grupo de microrganismos. Teria sido de grande utilidade inserir resultados de antibiogramas contra a fosfomicina, por exemplo, dado que se trata de um antibiótico com boa eficácia no tratamento da infecção urinária, de largo espectro e bem tolerado.

Os resultados foram obtidos com um sistema automatizado que não é a técnica de referência para os parâmetros estudados.

Para cada antibiótico em estudo, os resultados não são dados em CMI, mas apenas se um dado isolado é Sensível / Resistente para um dado antibiótico.

Verificou-se a importância do preenchimento de um inquérito no ato da colheita. A informação recolhida neste inquérito permitiu gerar grande quantidade de informação que após tratamento estatístico permitiu extrair conclusões úteis para o clínico e para o microbiologista na bancada do Laboratório. Além da informação contida neste inquérito já previamente referida, teria sido de grande utilidade uma lista de sintomas a preencher com caixas de verificação. A lista que propomos é a seguinte: disúria, urgência urinária, frequência urinária, oligúria, poliúria, desconforto abdominal, dor renal e febre. Com este inquérito, poderíamos separar cistite não complicada da pielonefrite. Poderíamos identificar o grupo dos idosos com bacteriúria assintomática, nos quais o tratamento tem mais efeitos adversos que benéficos<sup>11</sup>. Diante de dois ou mais dos sintomas acima referidos poderíamos interpretar com mais segurança os resultados de crescimento  $10^3$  e  $10^4$  em cultura pura ou não, com que nos deparamos na rotina, embora na rotina, quando estes elementos são necessários, o utente é contactado no sentido de os obter.

## **Perspetivas Futuras**

A segmentação da amostra em grupos de risco requer amostragens consideráveis para que os resultados obtidos nos subgrupos mais pequenos tenham relevância estatística. A continuação deste trabalho com a recolha dos dados epidemiológicos e a evolução das suscetibilidades aos antibióticos, mês após mês, teria grande interesse quer pela maior representatividade da amostra, quer sobretudo pelo acompanhamento das resistências ao longo do tempo na população estudada.



## Apêndice I

Tabela 1.7 (página seguinte) – Resultados dos antibiogramas no total da amostragem e por grupos de risco. Para cada grupo são apresentados o número de estirpes que foram testadas contra um dado antibiótico e a percentagem de casos sensíveis.

O número de antibióticos testados é variável porque depende de cada carta de antibiograma e da estirpe testada. O trimetoprim-sulfametoxasole é o único antibiótico que foi testado contra todos os isolados (porque está presente em todas as cartas de antibiograma) e assim o número de estirpes testadas contra esse antibiótico indica o N amostral de isolados testados cada grupo de risco. Para cada um dos restantes antibióticos, a diferença entre o número de estirpes testadas para esse antibiótico e o número total de estirpes testadas contra o trimetoprim-sulfametoxasole é um indicador da representatividade do valor obtido.

Foram considerados como resistentes todos os fenótipos que o equipamento reportou como intermédio ou duvidoso e resistente.

		ESBL	Penicilina G	Amoxicilina	Amox + Ac.Clavulânico	Cefalotina	Cefuroxima	Cefuroxima Axetil	Cefotaxima	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Teicoplanina	Vancomicina	Tetraciclina	Gentamicina	Fosfomicina	Amicacina	Tobramicina	Piperac-Tazobac	Imipen	Meropenem	Nitrofurantoina	TMP-STX
Estirpes testadas			11	145	135	135	142	142	135	141	141	146	4	11	11	145	4	141	141	141	14	140	146	152
Estirpes sensíveis na população total (%)		7	36%	44%	76%	56%	81%	77%	94%	94%	77%	77%	100%	100%	18%	94%	50%	97%	94%	87%	93%	100%	77%	66%
Estirpes testadas			1	25	24	24	25	25	24	24	24	25	0	1	1	24	0	24	24	24	1	24	25	25
Estirpes sensíveis no subgrupo de mulheres entre os 20 e os 49 anos excluindo infecções de repetição (%)		0	100%	64%	79%	79%	88%	88%	100%	96%	96%	96%	–	100%	0%	100%	–	100%	100%	88%	100%	100%	88%	84%
Estirpes testadas			3	45	43	43	44	44	43	43	43	46	2	3	3	45	2	43	43	43	1	43	46	46
Estirpes sensíveis no subgrupo de mulheres entre os 20 e os 49 anos incluindo infecções de repetição (%)		0	33%	64%	84%	72%	93%	89%	100%	98%	95%	96%	100%	100%	33%	100%	50%	98%	98%	88%	100%	100%	87%	83%
Estirpes testadas			3	11	9	9	10	10	9	9	9	12	2	3	3	11	2	9	9	9	1	9	12	12
Estirpes sensíveis no subgrupo das grávidas (%)		0	33%	45%	67%	44%	80%	80%	100%	89%	100%	100%	100%	100%	33%	100%	50%	89%	89%	89%	100%	100%	92%	83%
Estirpes testadas			7	64	58	58	62	62	58	63	63	65	3	7	7	66	3	63	63	63	10	62	65	70
Estirpes sensíveis no subgrupo dos portadores de infecções de repetição (%)		4	29%	41%	71%	45%	74%	66%	91%	94%	65%	66%	100%	100%	29%	91%	33%	94%	87%	78%	90%	100%	75%	53%
Estirpes testadas			3	26	24	24	26	26	24	28	28	27	1	3	3	29	1	28	28	28	7	27	27	31
Estirpes sensíveis no subgrupo dos portadores de 3 ou mais infecções de repetição (%)		3	33%	27%	67%	38%	69%	62%	92%	93%	46%	48%	100%	100%	0%	83%	0%	89%	75%	71%	86%	100%	70%	42%
Estirpes testadas			1	16	15	15	16	16	15	19	19	16	0	1	1	19	0	19	19	19	6	18	16	20
Estirpes sensíveis no subgrupo dos algaliados (%)		3	100%	13%	33%	13%	50%	38%	80%	84%	32%	31%	–	100%	0%	68%	–	89%	68%	63%	83%	100%	38%	25%
Estirpes testadas			0	9	9	9	9	9	9	11	11	9	0	0	0	11	0	11	11	11	2	10	9	11
Estirpes sensíveis no subgrupo dos acamados (%)		2		11%	56%	33%	67%	44%	89%	82%	36%	44%	–	–	–	64%	–	82%	55%	73%	50%	100%	33%	45%
Estirpes testadas			2	19	17	17	19	19	17	21	21	19	0	2	2	21	0	21	21	21	6	20	19	23
Estirpes sensíveis no subgrupo dos diabéticos (%)		2	0%	21%	76%	24%	63%	58%	88%	90%	57%	53%	–	100%	0%	86%	–	95%	86%	81%	83%	100%	68%	39%
Estirpes testadas			7	64	57	57	62	62	57	62	62	64	2	7	7	64	2	62	62	62	11	61	64	69
Estirpes sensíveis no subgrupo dos idosos (%)		7	29%	23%	63%	35%	66%	61%	86%	87%	58%	58%	100%	100%	14%	91%	50%	95%	90%	81%	91%	100%	72%	45%
Estirpes testadas			3	33	29	29	31	31	29	29	29	33	2	4	4	31	2	29	29	29	2	29	33	33
Estirpes sensíveis no subgrupo dos idosos s/ fatores de risco (%)		3	33%	30%	69%	48%	74%	74%	90%	86%	66%	64%	100%	100%	25%	100%	50%	97%	97%	90%	100%	100%	91%	58%
Estirpes testadas			0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	0	0	0	12	0	12	12	12	0	12	12	12
Estirpes sensíveis no subgrupo de crianças e jovens até aos 19 anos (%)		0	–	50%	83%	75%	92%	92%	100%	100%	100%	100%	–	–	–	100%	–	100%	100%	100%	–	100%	50%	83%
Estirpes testadas			0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	0	4	0	4	4	4	0	4	4	4
Estirpes sensíveis no subgrupo de homens entre os 20 e os 64 anos (%)		0	–	25%	100%	100%	100%	75%	100%	100%	75%	75%	–	–	–	100%	–	100%	100%	100%	–	100%	75%	75%
Estirpes testadas			1	15	14	14	15	15	14	14	14	15	0	1	1	14	0	14	14	14	1	14	15	15
Estirpes sensíveis no subgrupo de mulheres entre os 50 e os 64 anos (%)		0	100%	80%	93%	71%	93%	93%	100%	100%	93%	93%	–	100%	0%	100%	–	100%	100%	93%	100%	100%	93%	93%

## Bibliografia

---

- <sup>1</sup> Narciso A, Fonseca A, Cerqueira SA, Duarte A, Susceptibilidade aos antibióticos de bactérias responsáveis por cistites não complicadas: estudo comparativo dos isolados de 2008 e 2010. *Acta Urologica* – Marco de 2011 – 1: 16–21
- <sup>2</sup> Silva A, Machado P, Rodrigues V, Duarte A. Bactérias uropatogénicas identificadas de cistites não complicadas de mulheres na comunidade. *Acta Urol.* 2008, 25; 3: 9-14
- <sup>3</sup> Buckley, MM; Brogden, RN; Barradell, LB; Goa, KL (1992). Imipenem/cilastatin. A reappraisal of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 44 (3): 408–44.
- <sup>4</sup> <http://www.infarmed.pt/prontuario/framenavegaarvore.php?id=2> Consultado em 02.12.2011
- <sup>5</sup> Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 2011 Aug;19(8):419-26.
- <sup>6</sup> Al-Mathkhury HJ, Ali AS, Ghafil JA. Antagonistic effect of bacteriocin against urinary catheter associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *N A J Med Sci (Hamilt).* 2011 Aug;3(8):367-70.
- <sup>7</sup> Hannan TJ, Mysorekar IU, Hung CS, Isaacson-Schmid ML, Hultgren SJ. Early severe inflammatory responses to uropathogenic *E. coli* predispose to chronic and recurrent urinary tract infection. *PLoS Pathog.* 2010 Aug 12;6(8).
- <sup>8</sup> Williams textbook of endocrinology. (12th ed.). Philadelphia: Elsevier/Saunders. pp. 1371-1373.
- <sup>9</sup> Geerlings SE. Urinary tract infections in patients with diabetes mellitus: epidemiology, pathogenesis and treatment. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 Feb;31 Suppl 1:S54-7.
- <sup>10</sup> Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med.* 2002 Jul 8; 113 Suppl 1A:14S-19S.
- <sup>11</sup> Scottish Intercollegiate Guidelines Network. Management of suspected bacterial urinary tract in adults. A national clinical guideline. 2006.

Relatório de Estágio  
Valência de Bioquímica

## **Abreviaturas**

5-HIAA - Ácido 5-Hidroxiindolacético

5-HT - 5-hidroxitriptamina

ACTH - Adrenocorticoestimulina

ADH - Hormona antidiurética

AEQ - Avaliação Externa da Qualidade

AHV – Ácido Homovanílico

APO B – Apolipoproteína B

AVM – Ácido Vanilmandélico

AVP - Arginina vasopressina no plasma

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

cAMP - Adenosina monofosfato cíclico

CHGM – Concentração da Hemoglobina globular média

CLIA – Clinical Laboratory Improvement Amendments

CQI - Controlo da Qualidade Interno

CV – Coeficiente de variação

ET – Erro total

ICV – Índice de coeficiente de variação

ID – Índice de desvio

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

MAO – Monoamino Oxidase

MC – Manual de Colheitas do Laboratório Dr. Joaquim Chaves, versão 2009 que consulte ao longo do estágio.

MSH - Hormona estimuladora do melanócito

RBL – Reagent Blank

RBP - Proteína Fixadora de Retinol

SD – Desvio padrão

TDM – Monitorização de drogas terapêuticas

VCAM-1 - Molécula de adesão vascular 1

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

VIP - Polipéptido intestinal vasoativo

## **Planificação do trabalho na valência de Bioquímica**

No Laboratório de Análises Clínicas de rotina a automatização já não é dispensável. Os equipamentos autoanalisadores são peça fundamental do Laboratório de Análises Clínicas.

O autoanalisador (contactei com o Olympus 2700 no Labomarques e com o Advia 2400 no Joaquim Chaves) pode ser programado para se ligar automaticamente no início do dia de trabalho e fazer as primeiras lavagens. Em alternativa pode ser ligado e lavado manualmente.

No caso do Advia 2400, faz-se inicialmente a verificação dos níveis de água destilada para as lavagens, do soro fisiológico para as diluições e, das soluções de lavagem Probe wash 1 e Probe wash 2 e do tampão ISE Buffer.

No caso do Olympus 2700 faz-se inicialmente a verificação dos níveis de lixívia (posição W1) e detergente B para as lavagens, verifica-se o nível da água destilada para as diluições na posição “Dilution”.

Além da manutenção diária, cada equipamento tem outras recomendações do fabricante quanto a manutenções e verificações semanais, quinzenais, mensais ou com outra periodicidade. Podem-se tratar de verificações de sistemas mecânicos (tubos, bombas, seringas, pipetas), limpezas (filtros, depósitos, leitores de códigos de barras, sensores, etc.) salvaguarda de dados, etc. Algumas destas operações poderão ser efetuadas pelos técnicos do laboratório, outras poderão ser executadas apenas por pessoal técnico da casa comercial.

Depois são verificados os stocks dos reagentes a bordo para cada parâmetro. Os vários autoanalisadores apresentam para cada parâmetro e para cada lote de reagente o número de testes restantes, a estabilidade a bordo em dias, assim como o número de dias que faltam para a próxima calibração programada.

Consoante o gasto médio diário (que varia com a dimensão do laboratório e o parâmetro em questão) assim são definidos os valores mínimos de reagente para cada parâmetro a bordo, que dão a indicação de colocação de novo frasco ou de novo lote no equipamento.

A verificação dos reagentes no início do dia de trabalho visa evitar mudanças de reagente a meio do trabalho que podem implicar novas calibrações e interrupções na rotina. Após a substituição dos reagentes que estão prestes a terminar ou por volume insuficiente ou por fim da validade e a reposição de novos kits ou lotes, inicia-se o processo de calibração das técnicas que o requeiram. A colocação a uso de um novo lote, o fim da validade da calibração anterior ou uma reparação ou revisão de fundo no equipamento podem ser causas para uma calibração no início do dia de trabalho.

É necessário efetuar o branco de reagente diariamente e quando

- O intervalo de calibração expirou
- Se coloca um novo lote de reagente
- O controlo de qualidade assim o indicar

Quando todas as técnicas estão calibradas, são colocados os controlos. Cada parâmetro pode ter um número variável de níveis de controlo e está estipulado qual a alternância dos vários níveis.

Pode haver ainda técnicas que o Laboratório tenha definido com calibração diária. Para dar um exemplo, no Advia 2400 instalado no Laboratório Dr. Joaquim Chaves, foi identificada a necessidade de calibrar diariamente o Cálcio, o Magnésio e a Creatinina para assegurar bom desempenho destas técnicas.

Os calibradores podem ser liofilizados ou prontos a usar. As calibrações podem ser de 3 tipos, os exemplos são os do Advia 2400:

- Absolutas
  - enzimas
  - RBL (branco de reagente) efetuado apenas com água destilada
- Um ponto
  - química geral
  - RBL (branco de reagente e calibrador de química)
- Múltiplo
  - químicas especiais (IgA, IgG, TDM's, etc)
  - Calibrador multinível

Os calibradores liofilizados são reconstituídos num determinado volume, no caso do Advia 2400, em 3mL de água destilada e homogeneizados durante 30 minutos. São estáveis a 48H entre 2 e 8°C exceto as bilirrubinas...

No caso do Olympus 2700 existe um código de cores para cada tipo de rack: rack azul para branco de reagente, rack amarela para calibradores e rack verde para os controlos. Os soros dos utentes são transportados em racks cinzentas.

### **Linearidade e diluições**

No Advia 2400 o calibrador APO B é diluído em 1:4 soro fisiológico, os restantes calibradores são todos diluídos em água destilada. Quando todos os controlos são validados, podem ser colocadas as amostras o prato STT ou ligar o online da cadeia robótica de forma a alimentar o aparelho com amostras. Existem 2 pratos onde se colocam os reagentes, o R1 e o R2.

Reagentes do Advia 2400:

- Alguns estão prontos a usar;
- Alguns precisam de preparação;
- Alguns têm só o reagente R1 (tampa branca), enquanto outros têm os reagentes R1 e R2 (tampa azul),

Após ter reposto os níveis ou substituído os reagentes é necessário efetuar um *barcode scan*, que é sempre seguido por uma verificação dos níveis de cada reagente. A partir do nível, o equipamento calcula o número de testes ainda disponíveis.

Dado que cada frasco de reagente possui um código de barras, mesmo que o operador se engane na colocação de um novo reagente no equipamento, este erro não tem qualquer reflexo nos resultados dos controlos e da amostra dado que o equipamento utiliza a informação dos códigos de barras. Observei que é prática corrente preencher um novo recipiente com o resto do reagente existente no recipiente que estava a bordo, desde que do mesmo lote e com a mesma validade. Aqui existe a possibilidade de introduzir erro dado o fator humano, no entanto, este risco pode ser minorado tratando um reagente de cada vez. A utilidade / necessidade desta prática pode ser questionada se houver dúvidas que este procedimento não seja absolutamente isento de erro, até porque se ocorrer um erro nesta fase, pode não ser visível na calibração e execução do controlo interno, podendo afetar a qualidade do resultado do utente. É questionável que se um erro no preenchimen-



to de um recipiente possa afetar o resultado de um utente sem afetar o controlo interno, de qualquer forma, assumir que se houver um erro num recipiente este se manifesta no controlo interno, vai contra o princípio defensivo que deve orientar todo o processo analítico de fazer bem à primeira para evitar de ter de tomar medidas corretivas. Por outro lado, a possibilidade de erro que descrevo acima é idêntica à que se verifica nas técnicas manuais, que sempre existiram no Laboratório de Análises Clínicas. No entanto uma das vantagens que a automatização veio trazer foi a possibilidade de reduzir o erro.

Um autoanalisador pode executar análises com os kits da própria marca ou de outras marcas, sendo para isso necessário especificar o comprimento de onda (ou comprimentos de onda) em que a técnica é lida. Segue-se depois a calibração do método. Geralmente os fabricantes de equipamentos abertos têm instruções para adaptar os kits de outras marcas assim como os reagentes para equipamentos automatizados também têm informações de como adaptar uma técnica de outro fabricante a cada equipamento.

Tal como os reagentes, também os controlos de qualidade internos podem ser os do próprio kit de reagente ou podem ser de outra casa comercial. O facto de se tratar de um reagente de outra casa comercial pode ser vantajoso por ter uma matriz e uma origem diferente do calibrador e poder assim ser um resultado mais independente. Nada nos diz que um controlo e um calibrador da mesma casa comercial não sejam produzidos a partir da mesma fonte ou da mesma *pool* de soros, introduzindo apenas um fator de diluição. Nesse caso, o controlo pode ter sempre ótimos resultados, mas a qualidade do resultado só pode ser assegurada pela avaliação das médias móveis e sobretudo pela participação nos programas de controlo externo da qualidade.

No entanto o recurso a controlos internos exteriores ao kit de reagente tem geralmente custos que devem ser ponderados para cada técnica.

Num Laboratório com grande número de parâmetros e grande volume de amostras como é o Laboratório central do Grupo Joaquim Chaves, as técnicas podem estar distribuídas por vários equipamentos idênticos, quer para melhor distribuição do trabalho e rapidez de execução, quer para haver a redundância que permita continuar a dar resultados em caso de avaria de um dos equipamentos.

Geralmente todos os autoanalisadores têm também uma forma de introduzir amostras prioritárias com uma ou várias posições para tubos de urgência.

## **Controlo da Qualidade Interno (CQI)**

Há autoanalisadores que têm a possibilidade de armazenar e fazer o tratamento estatístico dos dados do CQI. Mas nem sempre essas ferramentas dão ao utilizador todas as possibilidades de que este necessita para agir em conformidade com as normas internas para o tratamento desses dados. Basta que por exemplo o equipamento leia os códigos de barras do controlo interno e coloque de forma automática os valores do intervalo de aceitação que vêm de fábrica para que o utilizador não possa introduzir outros valores (o desvio padrão dos primeiros 5 pontos ou dos primeiros 20 pontos). Além disso, é o próprio James Westgard o primeiro a apresentar reticências aos equipamentos e casas comerciais que reclamam que os seus produtos incluem as regras de Westgard no tratamento dos resultados do controlo interno (informação que nem sempre é possível confirmar – quais regras e como são aplicadas). Segundo Westgard, a aplicação destas regras de forma cega e indiferenciada a todos os parâmetros, sem ter em conta a relevância clínica do parâmetro, é o primeiro passo para a rejeição de pontos que não são de facto erros (com o aumento dos custos em reagentes e tempo de trabalho) e por outro lado a aceitação de outros pontos que dada a relevância biológica e clínica do parâmetro, colocam em risco a qualidade do resultado dado ao utente.

Assim, a possibilidade de transferir os resultados do CQI via online para um outro computador onde este tratamento estatístico possa ser feito é de grande utilidade. Por vezes existe uma comunicação online para transferência dos resultados dos utentes, mas não para os resultados do controlo interno. Nestes casos, os dados podem ser transcritos para uma folha de cálculo, no entanto, se o número de parâmetros for grande, este trabalho de transcrição pode ser demorado, e não é isento de erro. Mas as demoras e erros são precisamente o que o técnico de análises clínicas menos quer nesta fase do trabalho: ele quer passar todas as calibrações e controlos, fazer as repetições que sejam necessárias e mal o equipamento esteja apto, iniciar a rotina com a colocação das amostras dos utentes. Após as calibrações e a colocação dos controlos, cada minuto conta para poder começar a introduzir as amostras dos utentes no equipamento.

Uma abordagem para o tratamento dos resultados do controlo interno é a seguinte:

Os pontos de cada nível de controlo interno podem ser colocados numa folha de cálculo. Para os primeiros 5 pontos de um novo lote são utilizados os valores do intervalo de aceitação que vem de fábrica. A partir desses 5 pontos utiliza-se o desvio padrão obtido até então como intervalo de aceitação, e a partir dos 20 pontos utiliza-se o desvio padrão obtido com a amostragem dos 20 primeiros pontos, desde que estes intervalos estejam contidos dentro do intervalo definido de fábrica. Desta forma a estabilidade do reagente é avaliada desde o dia em que é aberto e resolve-se o problema de por vezes as casas comerciais darem intervalos de aceitação muito largos para os seus controlos, de forma que possam ser aceites, mesmo que a estabilidade do reagente seja baixa. Por outro lado o intervalo de aceitação é o próprio desvio padrão amostral do controlo, com a vantagem de ser o mais exigente que é possível com esse material, podendo assim variar substancialmente de lote a lote, mas também tem desvantagens: verifiquei que em raras situações, se nos primeiros 5 pontos o controlo tiver um coeficiente de variação muito baixo (pontos que por coincidência se situam muito próximos entre si), o desvio padrão que daí resulta é muito exigente e poderá implicar que nos 15 pontos seguintes existam pontos indevidamente descartados e que portanto tenham que ser aceites após devida justificação.

À medida que se vão somando os pontos de controlo de um lote, a folha de cálculo pode conter as fórmulas que vão alertando para o facto de as regras de Westgard estarem ou não a ser observadas e da necessidade de medidas corretivas com a repetição de determinações de controlo (caso se suspeite de um valor afetado por erro aleatório) ou de nova calibração / ajuste do equipamento ou técnica caso se suspeite de erro sistemático.

Opto pela notação utilizada pelo Dr. James Westgard nos seus artigos, embora haja outras notações utilizadas por outros autores. Segundo esta notação, quando escrevemos  $1_{3s}$  o primeiro algarismo indica o número de medições que ultrapassa o limite, que neste caso é 3 desvios padrões (S do inglês *standard deviation*).

As regras múltiplas de controlo de qualidade (ou regras de Westgard):

- Quando um único ponto de controlo ultrapassar os três desvios padrões (3S), o controlo não pode ser aceite – Regra  $1_{3s}$
- Quando uma medição de controlo excede o limite de 2S, deve ser dada particular atenção aos dados do controlo. Esta regra não significa que o controlo não possa ser aceite, mas sobretudo quando as cartas de controlo eram desenhadas à mão funcionava como

um sinal de alerta que levava o operador a verificar se alguma das outras regras estava em risco, ou estava realmente de ser violada – Regra de advertência  $1_{2s}$

- Quando 2 medições de controlo consecutivas excedem o mesmo limite de  $2S$ , o controlo não pode ser aceite. Esta regra vigia o erro sistemático ou se existe um viés ao valor alvo – Regra  $2_{2s}$
- Quando uma medição de controlo excede um limite de  $2S$  e a seguinte excede o limite de controlo  $2S$  de sinal contrário, o controlo não pode ser aceite. Esta regra vigia o erro aleatório e a estabilidade do controlo entre duas medições consecutivas – Regra  $R_{4s}$
- Quando quatro medições de controlo consecutivas excedem o mesmo limite de  $1S$ , o controlo não pode ser aceite – Regra  $4_{1s}$
- Quando 10 medições de controlo consecutivas estiverem do mesmo lado em relação à média, o controlo não pode ser aceite. Tal como a anterior, trata-se de uma regra que vigia o erro sistemático – Regra  $10_x$

Embora as regras de Westgard sejam uma preciosa ajuda no dia-a-dia do laboratório, não são suficientes para garantir que a estabilidade do controlo é adequada ao significado biológico do parâmetro em causa. O desempenho de um lote de controlo deve ainda ser avaliado confrontando o erro total obtido com o erro total admissível. Para cada parâmetro, o erro total admissível é definido consoante o significado biológico. Um erro de 10% para, por exemplo, ácido úrico pode não ter grande significado biológico, mas a mesma variação nos valores dos eletrólitos pode significar a diferença entre um valor normal e um valor letal. Cada laboratório define os seus valores de erro total admissível desde que em concordância com as guidelines da CLIA.

Para determinar o erro total de uma amostra são necessários os seguintes indicadores:

- Coeficiente de variação

medida de dispersão que permite comparar diferentes distribuições com diferentes ordens de grandeza. Calcula-se dividindo o desvio padrão amostral pela média amostral. Se for multiplicado por 100 é expresso em percentagem.

$$CV = \frac{SD}{\mu_{\text{amostral}}}$$

- Índice de desvio ou Bias

medida de afastamento ao alvo, é determinado subtraindo a média amostral à média alvo e dividindo este valor pela média alvo. Se for multiplicado por 100 é expresso em percentagem. O índice de desvio é negativo se a média amostral < média alvo em valor absoluto.

$$ID = \frac{\mu_{\text{amostral}} - \mu_{\text{alvo}}}{\mu_{\text{alvo}}}$$

- Erro total

soma do índice de desvio (em valor absoluto) com o coeficiente de variação multiplicado por um fator (x 1,65). O erro total é expresso em percentagem se as duas parcelas que o constituem também o forem.

$$ET\% = ID\% + 1,65 \times CV\%$$

- ICV

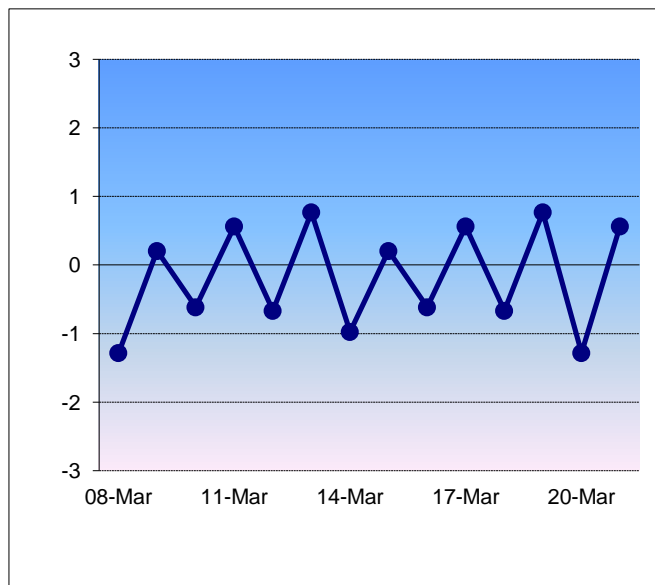
medida de dispersão dos resultados face ao erro máximo admissível ou critério de aceitação. É também uma medida de desempenho deste controlo face ao significado biológico da sua variação. Quanto mais baixo for este valor (mais próximo de zero), melhor é o desempenho do controlo. Considera-se que  $ICV \leq 1,8$  corresponde a uma imprecisão  $\leq 80\%$ .

$$ICV = \frac{CV}{0,25 \times ET\%_{\text{admiss}}}$$

Ao longo da execução do mês deve ser dada particular atenção aos valores do coeficiente de variação e ao erro total do nível. Também o índice de desvio deve ser observado, mas geralmente erros de viés são facilmente detetados quer pela observação dos gráficos de Levey-Jennings, quer pelo cumprimento das regras de Westgard  $4_{1s}$  e  $10_x$ , quer pelo próprio valor da média amostral e do seu desvio à média alvo.

Durante o meu estágio constatei que deve ser dada uma atenção especial à imprecisão e às suas consequências no erro total, porque podemos ter um controlo que esteja 100% de acordo com as regras de Westgard e que no entanto possa ter um erro total entre os 8 e os 9% e para alguns parâmetros da Bioquímica este valor de erro total é já demasiado alto, vejamos os dados que têm erros totais admissíveis entre 2% e 5%.

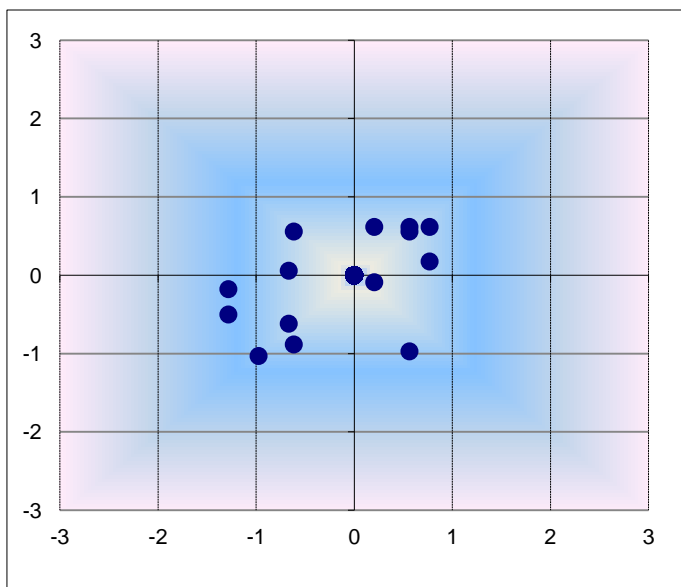
No caso do gráfico de Levey-Jennings ao lado, cumpre todas as regras de Westgard mas tem um erro total de 3,11% o que para o caso do Sódio, já seria não aceitável.



Neste sentido, embora a exigência dos valores de aceitação de um controlo não tenha reflexo direto nos parâmetros de desempenho referidos acima (CV, ID, ET e ICV), mas apenas interfira no desvio padrão esperado, é esse intervalo que vai determinar se um dado resultado do controlo vai ser ou não aceite, e por isso tem todo o interesse utilizar os primeiros 5 e os primeiros 20 pontos para determinar o intervalo de aceitação, desde que este esteja contido no intervalo pelo fabricante, porque dessa forma temos o intervalo de aceitação mais exigente que é possível utilizar para este material de controlo / método / técnica.

Os valores de erro total podem ser aferidos pela introdução das respetivas fórmulas na folha de cálculo e podem ser monitorizados ponto a ponto, sendo possível tomar medidas, (nova calibração, abertura de novo lote de controlo, manutenção do equipamento e limpeza de componentes críticos) antes do lançamento dos resultados dos utentes (preferencialmente antes do início da corrida) e obviamente antes do fim do mês ou do lote. No final do mês ou do lote pode ser elaborado um quadro resumo que dá a informação condensada de todos os indicadores para todos os níveis de controlo de todos os parâmetros numa só página.

Quando 2 ou mais níveis de controlo são ensaiados para o mesmo parâmetro é muito útil recorrer à análise de Youden que compara o resultado de cada nível com os restantes e que é um bom indicador quer da robustez do método quer da presença de viés relativamente ao alvo e se esse afastamento afeta um ou vários níveis.



A robustez do método assume particular importância quando os critérios são apertados – reflexo do significado biológico do parâmetro em questão. Com um mau método nunca podemos ter uma boa carta de controlo e resultados confiáveis. Um erro que se pode cometer quando se tem um controlo instável é repetir-lo várias vezes “até dar bem” isto é, até dar um valor bastante próximo da média alvo (dentro de 1S por exemplo). Ora este procedimento por si permite obter uma carta de controlo artificialmente boa, mas que na realidade não espelha a imprecisão do método, que é maior. O resultado do Sódio, por exemplo, está afetado por um erro total não de 1,8% como indicado na carta de controlo, mas de um valor maior, e o pior é que não se sabe qual é realmente esse valor de erro. Assim, a repetição dos valores de controlo deve estar reservada a situações em que se suspeite de um erro aleatório devido a um problema com o material de controlo, erro de pipetagem, etc., em que o valor obtido esteja fora da “nuvem de pontos” esperada. Por vezes a fronteira entre o *outleir* e o ponto normal que nos aumenta o erro é ténue, mas neste como em todos os outros casos deve prevalecer a ética. As opções que os equipamentos analíticos oferecem neste campo são variadas como “ocultar resultado” geralmente permitem ao auditor ver o histórico completo e ver quais os pontos que foram desprezados e com qual justificação.

Se um método não tem valores satisfatórios de erro total, devem ser equacionadas todas as hipóteses, desde a verificação do cumprimento de todos os procedimentos de manutenção e operação, a verificação do equipamento por um técnico, abertura de novos lotes de reagente e de controlo até substituição por outra técnica / equipamento com melhor desempenho.

Devo dizer que ao longo da minha experiência profissional e durante o estágio quer no Labomarques, quer no Laboratório Dr. Joaquim Chaves pude verificar como o rigor e a ética pautam o dia-a-dia dos profissionais com que contactei, o que constitui uma excelente mais-valia e uma referência para o meu percurso profissional.

### **Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)**

A AEQ é outro dos pilares que garante a qualidade e a reprodutibilidade dos resultados entre laboratórios. Estão disponíveis vários programas de AEQ com periodicidade de envio de amostras que pode ser mensal, trimestral ou semestral. Também os custos, a qualidade dos materiais e os tempos de envio dos resultados são variáveis. Materiais de controlo liofilizados estão em princípio menos sujeitos às condições de transporte e armazenamento. Programas de AEQ em que a resposta esteja disponível poucos dias após a data de fecho das respostas, dão ao Laboratório uma informação útil, que permite tomar medidas preventivas ou corretivas.

As amostras da AEQ são tratadas como quaisquer outras amostras e são cegas para o resultado. O resultado dado pelo Laboratório é confrontado com um valor alvo dado por um método de referência, ou com o resultado que é a média de todos os laboratórios participantes. Ambas as abordagens têm vantagens e inconvenientes como veremos adiante.

À sua chegada ao Laboratório, os resultados da AEQ são validados para verificar a sua conformidade e implementar eventuais medidas. Eis alguns parâmetros estatísticos úteis:

O Índice de Desvio (ID) é calculado dividindo a diferença entre o resultado do Laboratório e o resultado alvo sobre o desvio padrão amostral. O desvio padrão amostral é dado pela entidade organizadora do programa de AEQ e exprime a dispersão de todas as respostas dos laboratórios participantes.

$$ID = \frac{R_{\text{Lab}} - R_{\text{alvo}}}{DP_{\text{amostral}}}$$

O ID quantifica o afastamento do nosso resultado relativamente ao esperado comparado com o dos outros participantes. Admitindo que os resultados dos participantes seguem uma distribuição normal, se este índice for menor que 1 significa que o resultado do Laboratório se encontra dentro de um desvio padrão (1S), se o índice for maior que 1, o resultado do Laboratório encontra-se fora de 1S.



O Erro é obtido dividindo a diferença entre o resultado do Laboratório e o resultado alvo sobre o resultado alvo, isto é: dá-nos uma informação sobre o afastamento do nosso resultado relativamente ao alvo. Este parâmetro possibilita a comparação de diferentes erros de diferentes ordens de grandeza, dado que a divisão pelo valor alvo permite obter um valor percentual.

$$E\% = \frac{R_{\text{Lab}} - R_{\text{alvo}}}{R_{\text{alvo}}}$$

Com este parâmetro podemos quantificar o erro do nosso resultado independentemente do erro dos restantes participantes no programa de AEQ, e independentemente do número de participantes.

A finalidade da AEQ é uniformizar os resultados de diferentes técnicas/métodos executados em diferentes laboratórios em diversos países e com diferentes operadores. Cada Laboratório que utilize as várias ferramentas para quantificação e diminuição do erro (o controlo do erro na fase pré-analítica, o CQI e a AEQ) com resultados conformes, pode dar resultados com a garantia de qualidade de ter o erro sob controlo. Quando os resultados da AEQ para um dado parâmetro se afastam do alvo há que investigar a causa, se é pontual ou obedece a um padrão, e identificar eventuais medidas corretivas.

Quando um desvio do resultado da AEQ é pontual e não tem histórico (e se não se repete nos ensaios seguintes), é possível, pela rastreabilidade que caracteriza todo o processo analítico, saber quais os lotes de reagente em uso no dia da determinação, os resultados do controlo interno (se os resultados do CQI acompanham a tendência verificada no ensaio da AEQ), eventuais intervenções realizadas no equipamento, problemas no fornecimento de água ultra pura, erros na manipulação das amostras de AEQ como má homogeneização ou erros de pipetagem, o operador de serviço, etc. Também as condições de transporte e armazenamento das amostras de AEQ podem ser causa de erro e por isso devem ser verificadas à chegada destas.

Quando o desvio mostra uma tendência que se mantém em várias amostras de AEQ, além das averiguações acima mencionadas, que também podem estar na base de um erro sistemático, deve-se verificar o desempenho de outros equipamentos / método / reagentes similares participantes no ensaio de AEQ (sempre que esses dados estejam disponíveis) de forma a identificar um padrão ou uma causa. Pode ser necessário contactar a casa comer-

cial para realizar uma verificação, atualização de *software*, ou no limite, mudar de reagente / equipamento. Pode tratar-se de um problema de matriz do material de controlo, que afeta um determinado equipamento ou conjunto de equipamentos.

O aparecimento de resultados de AEQ fora do alvo, sem um desvio correspondente nos resultados do controlo interno, também pode acontecer quando se utilizam materiais de controlo da própria casa comercial que vende o kit ou os reagentes e pode ser esclarecida recorrendo a materiais de controlo interno de outra fonte ou outra marca comercial.

Quando o valor alvo é a média dos resultados obtidos pelos participantes, se houver uma técnica / equipamento preponderantes, podem introduzir um viés no resultado, que vai desfavorecer os participantes com técnicas / equipamentos minoritários. Mesmo quando o resultado alvo é resultante de um equipamento de referência, ou que os organizadores do AEQ consideram como referência, a questão matriz do material de controlo pode colocar-se na mesma. As medidas a tomar caso a caso vão como descrito acima, desde a comparação com outros equipamentos/ técnicas idênticos noutros laboratórios, e podem passar pela mudança de método, de equipamento ou de programa de AEQ para o parâmetro em causa, a introdução de fatores de correção quando devidamente fundamentada pela bibliografia ou pela prática laboratorial.

Uma outra forma de obter informação sobre a qualidade dos resultados, mas que não tem custos em reagentes, é a avaliação das médias móveis. Não obstante o facto de cada utente ter um valor discreto para um dado parâmetro, a população que visita o Laboratório num dado período de tempo (um dia ou uma semana de trabalho, conforme a dimensão do laboratório) tem um valor médio quase inalterado. Com a análise das médias móveis temos mais uma fonte de informação que nos permite avaliar eventuais flutuações de CQI ou AEQ e confirmar ou não um viés nos resultados.

## **Amostras biológicas e algumas considerações sobre a fase pré-analítica**

As amostras biológicas utilizadas na valência de Bioquímica, são soro, urina e plasma.

O soro é a amostra onde são realizadas a maioria das determinações. Para várias patologias e para o conhecimento do estado de homeostase, é útil a detecção / quantificação de metabolitos na urina, geralmente amostras de 24H ou primeira urina da manhã. Por fim, algumas determinações permitem a utilização de soro ou plasma, o que flexibiliza o processo quando se esgota um dos produtos (o que é particularmente relevante em amostras pediátricas, colheitas difíceis e processos com grande número de parâmetros pedidos).

A urina é certamente a amostra mais problemática, porque contém maior número de interferentes e por vezes os metabolitos a quantificar estão em quantidades muito diminutas.

## **Preparação do utente e fase pré-analítica**

Dada a sua importância para todo o processo analítico, insiro aqui um pequeno módulo sobre este assunto. Neste módulo recolho a minha experiência no estágio nos setores de bioquímica (Labomarques e Laboratório Dr. Joaquim Chaves), química analítica (Laboratório Dr. Joaquim Chaves) e colheitas (Labquer). Dado que dei particular atenção às amostras para Bioquímica (embora não exclusivamente) é neste relatório que me parece mais lógica a sua inserção.

Para todas as colheitas de sangue é aconselhado jejum desde a noite anterior, sobretudo para que as condições estejam o mais padronizadas possível e para minimizar as interferências que podem decorrer da existência de um soro quiloso, lipémico ou outro.

Para o perfil lipídico, em particular para a determinação dos triglicéridos, e para as análises de metabolitos que participam nas trocas energéticas como a glucose, o jejum é obrigatório e a sua não observância inviabiliza a realização da colheita, ou em condições especiais, tem de ter uma justificação aceitável e deve ser tida em conta na validação dos resultados. No caso das provas dinâmicas como a tolerância oral à glucose, as curvas da insulina e do péptido C, deve ser verificado o histórico de valores de glucose em jejum. Com o auxílio de uma tira teste, pode ser verificada a existência de glicosúria. Doentes com glicosúria positiva ou glicemias em jejum superiores a 140mL/dL não estão indicados para estes testes dinâmicos com toma de glucose. Nestes casos deve-se efetuar a colheita 1 ou 2 horas após uma refeição (conforme pedido do médico), e sem suspender a medicação. Após o início da prova o utente deve manter o repouso absoluto e não ingerir café, chá, não fumar nem comer. Estas últimas recomendações aplicam-se também na prova de tolerância à lactose.

## **Soro hemolisado – um exemplo de aplicação à rotina em grande escala**

A hemólise, a lipémia e a icterícia são alterações das amostras de soro ou plasma que podem resultar de patologia ou de erro na fase pré analítica. A inspeção visual da amostra, uma boa prática necessária e útil no Laboratório de pequenas ou médias dimensões, pode tornar-se de difícil aplicação num Laboratório automatizado que processe mais de

1000 amostras por dia, que vise a rentabilização dos recursos e a otimização dos processos como é o Core Laboratorial do Laboratório Dr. Joaquim Chaves.

Dado que a minha experiência precedente era precisamente num Laboratório de médias dimensões em que os tubos de soro ou plasma eram cautelosamente verificados um a um, interessava-me saber como é que estas alterações das amostras eram tratadas e como é garantida a qualidade do resultado com tão grande número de amostras.

Tomo como exemplo a hemólise, artefacto que pode atingir 3,3% das amostras de um laboratório de análises clínicas de rotina, que geralmente é a principal causa de rejeição da amostra com cerca de 60% dos casos e 5 vezes mais frequente que a segunda causa (amostra insuficiente).

A hipercalémia é o principal artefacto analítico na amostra hemolisada. A rutura dos eritrócitos contamina a amostra com  $K^+$  intraeritrocitário de forma aproximadamente linear com a quantidade de células lisadas na amostra. São várias as abordagens na literatura para quantificar a hemólise e caracterizar a sua interferência nos resultados analíticos. Vários trabalhos visaram obter uma fórmula que permita corrigir o erro, dispensando a colheita de uma nova amostra, com o objetivo de garantir a exatidão do resultado calculado. Algumas dessas fórmulas baseiam-se no valor da hemoglobina sérica para calcular o potássio eritrocitário libertado para o soro. No entanto a concentração de hemoglobina globular média (CHGM) tem considerável variabilidade entre indivíduos. Assim, Brescia e colaboradores testaram uma fórmula que calcula o potássio eritrocitário libertado na hemólise tendo em conta a Hemoglobina livre no soro (fsHb) e o CHGM. No cálculo é ainda utilizada uma outra grandeza que é a concentração intraeritrocitária de  $K^+$  ( $iK^+$ ), que é considerada constante (150nmol/L) dada a sua reduzida variabilidade e a importância da sua estabilidade para a homeostasia.

Assim a fórmula resultante é a que se apresenta ao lado, e que é aplicada à rotina no Laboratório Dr. Joaquim Chaves sempre que uma amostra hemolisada de soro é

$$gvK^+ = \frac{iK^+}{CHGM} \times fsHb$$

acompanhada por uma amostra de sangue total onde possa ser determinado a CHGM. Nos casos em que tal não seja possível recorre-se à nova colheita de soro, mas o número de repetições de colheita é muito menor do que sem a utilização desta fórmula.

Durante o meu estágio não pude verificar nem a eficácia nem os limites desta fórmula (nem era esse o meu objetivo). Para tal teria sido necessário um estudo sistemático que comparasse os resultados de  $K^+$  corrigidos pela fórmula na presença de várias concentrações de interferente com as respectivas amostras controlo sem hemólise, para toda a gama de concentrações de  $K^+$ , com particular atenção aos valores de decisão clínica.

Mas a hemólise não afeta apenas os valores de potássio sérico, mas afeta consistentemente vários outros parâmetros analíticos. Poderia ser interessante fazer uma revisão bibliográfica sobre este assunto e ensaiar uma aplicação desses resultados à rotina. Por fim há que ter em conta a variação do comportamento entre métodos diferentes para determinar o mesmo analito, já que diferentes métodos podem ter diferentes interferências e comportamentos.

A descrição das estratégias adotadas para cada analito e cada interferência ultrapassa largamente os objetivos deste relatório. Certo é que o salto para o laboratório que processa grandes quantidades de amostras requer um estudo apurado de cada interferência, para não deixar sair como certos resultados afetados por erro significativo. Por fim, a hemólise é apenas um dos interferentes (os outros interferentes principais são a lipémia a icterícia).

Felizmente as casas comerciais juntamente com os equipamentos autoanalísadores oferecem também soluções de correção dos resultados já testadas e prontas a usar. Por outro lado, os sistemas informáticos permitem introduzir fórmulas que corrigem grande número de resultados de forma imediata. Ao técnico superior de análises clínicas cabe interpretar os dados técnicos do equipamento, validar os seus cálculos, respeitar os limites de linearidade das correções, conhecer as condições de rejeição da amostra, comparar as soluções encontradas pela casa comercial com outras descritas na literatura e manter todo o processo atualizado ao estado da arte.

### **Condições de colheita adequadas a cada determinação**

Para todas as análises é aconselhável realizar a determinação assim que possível para evitar o consumo, degradação ou formação de metabolitos, contaminação da amostra, etc. No entanto algumas amostras ou alguns metabolitos têm condições especiais e a sua não observância pode colocar em causa a qualidade do resultado.

São muitas as moléculas biológicas sensíveis à luz por possuírem anéis aromáticos ou outras estruturas que absorvem luz e podem alterar a sua conformação. Assim, quando se pretende detetar ou quantificar estes analitos, as respetivas amostras de soro, plasma, urina ou fezes têm que estar protegidas da luz. Os exemplos são as vitaminas, bilirrubinas, serotonina, dopamina, adrenalina e outras catecolaminas, metanefrinas, enzimas como as cinases de caseína, cinase de creatina, coproporfirinas, as carboxiporfirinas (penta, hepta), porfobilinogénio, urobilinogénio, e drogas como o metotrexato. As amostras são envolvidas em papel de prata, o que significa que em todos os laboratórios e postos de colheita tem de haver um stock com papel de prata cortado e pronto a usar.

A alimentação tem uma grande influência nos níveis de inúmeros metabolitos quer no plasma quer na urina. Quando esses metabolitos são marcadores no diagnóstico de algumas patologias, a sua elevação por via alimentar pode originar falsos positivos e a sua determinação tem de ser precedida por uma dieta adequada.

A presença de dopamina, norepinefrina, serotonina, seus metabolitos e precursores (por exemplo, triptofano), em frutos, vegetais, nozes e outros alimentos está descrita na literatura, e a presença destas moléculas na urina após refeições ricas nestes alimentos está documentada.

A determinação do Ácido Homovanílico (AHV) e do Ácido Vanilmandélico (AVM), os dois metabolitos finais das catecolaminas (dopamina, epinefrina e norepinefrina) na urina de 24H, tem particular importância no diagnóstico dos tumores secretores de catecolaminas (por exemplo neuroblastoma e feocromocitoma). Para a determinação de AHV e AVM o Manual de Colheitas do Laboratório Dr. Joaquim Chaves, versão 2009 (MC), indica não comer vegetais, bananas, baunilha, chocolate, café, chá e nozes na véspera e no dia da colheita.

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é um produto da hidroxilação e carboxilação do L-triptofano. É um neurotransmissor amplamente estudado, também conhecido por molécula do bem-estar. A determinação de serotonina no soro e do principal produto do seu metabolismo Ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA) na urina de 24H podem ser de auxílio no diagnóstico de tumores carcinoides secretores de serotonina se aumentados, ou

um apoio ao diagnóstico de depressão severa se diminuídos. A diminuição dos níveis de serotonina na fenda sináptica está associada a distúrbios depressivos e os inibidores da recaptação da serotonina são antidepressivos utilizados na prática clínica. Níveis diminuídos de serotonina no plasma foram também associados a outras patologias.

Para a serotonina no soro e serotonina plaquetária, o MC indica que nos 3 dias antes da colheita, o utente não deve comer abacate, banana, ananás, ameixa, tomate, nozes e alimentos vegetais em geral. Para o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) na urina, o MC indica uma dieta sem bananas, nozes e vegetais no dia anterior à colheita.

A bula destes testes que no Laboratório são executados por HPLC com reagentes da Bio-Rad é mais detalhada: “Um dia antes da recolha da amostra de urina de 24 horas, o paciente deve abster-se de comer bananas (AVM, 5-HIAA), baunilha (AVM), chocolate e café (AVM, AHV), chá (AVM), nozes (5-HIAA) e vegetais (5-HIAA)”. Mas todo este detalhe pode ser difícil de transmitir ao utente, pelo que o MC opta por indicações mais abrangentes e de mais fácil aplicação. No que diz respeito aos fármacos, embora o MC seja omissos, a bula indica que “medicamentos contendo fenotiazinas não devem ser ingeridos 24H antes da recolha das amostras de urina para AVM, AHV e 5-HIAA”, e ainda, “medicamentos contendo ac. gentísico ou homogentísico (antirreumáticos) podem interferir com o procedimento AVM”.

O MC é omissos em relação aos fármacos a evitar na determinação da serotonina, mas fármacos como diazepam, fenobarbital, reserpina, e inibidores da MAO estão descritos como interferentes nos seus valores.

Quanto à determinação das Catecolaminas - Norepinefrina, Epinefrina e Dopamina no soro e na urina, o MC é omissos e a bula do kit indica: um dia antes da recolha da amostra, o paciente deve abster-se de comer bananas, café, ananás e nozes, embora Heinemann defenda que apenas as bananas e as nozes devem ser restringidas na determinação das catecolaminas urinárias e seus produtos do metabolismo (AVM e AHV).

Quanto às metanefrinas, plasmáticas e urinárias, totais ou fracionadas – normetanefrina e metanefrina nem a bula nem o MC apresentam restrições na dieta.



Dado que estas análises requerem na sua maior parte a recolha de uma urina de 24H, geralmente os utentes contactam o laboratório para obter as instruções e o recipiente antes de iniciarem a colheita. Durante o meu estágio pude contactar com alguns utentes que se apresentaram no laboratório para determinar alguns destes parâmetros se terem sido informados pelo médico e sem terem ligado previamente para o laboratório. Mas após breve esclarecimento prontificaram-se a regressar ao laboratório alguns dias depois após a devida preparação. Estes esclarecimentos são geralmente prestados pela receção do laboratório. Ao técnico de colheitas cabe a função de receber a amostra, verificar se as condições de colheita foram cumpridas, e nos casos em que seja necessário, esclarecer de novo o utente, solicitar a recolha de nova amostra e descartar a amostra não conforme.

Deve ser evitado o exercício físico intenso nos dias / horas que precedem a determinação de CK-MM no soro e lactato no plasma, dado que após o exercício, estes valores podem estar aumentados originando falsos positivos.

As colheitas para lactato no plasma e piruvato no plasma devem ser efetuadas sem garrote, dado que a diminuição do aporte de oxigénio nos tecidos tem efeitos imediatos nos níveis destes metabolitos. Durante o meu estágio encontrei muitas veias difíceis, mesmo com garrote, pelo que esta alínea pode ser difícil de aplicar em muitos utentes. Felizmente são parâmetros pouco pedidos no laboratório de rotina.

No caso da colheita para quantificação de metais no organismo é necessário assegurar que o tubo seco esteja isento de vestígios de metais e por isso tenha sido submetido a tratamento prévio com um agente quelante como o ácido nítrico. É o caso da colheita para quantificação de berílio, alumínio, silício, titânio, crómio, manganês, cobalto, níquel, cobre, zinco, arsénico, selénio, molibdénio, prata, tálio e bismuto.

Pode também ser necessário efetuar o ensaio de imediato após a colheita como no caso do piruvato no plasma. Também os ensaios de gasimetria:  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $pO_2$  e  $pCO_2$  em sangue arterial ou venoso requerem transporte em banho gelado e em seringa vedada. O curto tempo disponível para a obtenção dos resultados fiáveis após o ato de colheita requer que estas colheitas sejam feitas no local onde se encontra o equipamento de gasimetria, que no caso do Grupo Joaquim Chaves é o Laboratório Central.

Para alguns parâmetros é necessário centrifugar de imediato a amostra como é o caso do lactato no plasma, amônia no plasma, Ag HCV no plasma (técnica de tempo real) assim como a homocisteína no soro.

Há grande número de parâmetros que requer congelação imediata após centrifugação e separação do soro ou plasma conforme os casos. São eles: ACTH (adrenocorticoestimulina ou adrenocorticotrofina) no plasma, atividade renínica plasmática (ou renina ativa no plasma), adrenalina (ou epinefrina) no soro, angiotensina I e II no plasma, arginina vasopressina no plasma (AVP), catecolaminas no soro, dopamina no soro, vasopressina (ou hormona antidiurética ou ADH) no plasma, hormona estimuladora do melanócito (MSH) no plasma, noradrenalina (ou norepinefrina) no soro, ocitocina no plasma, somatostatina no plasma, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) no soro, glucagon no plasma, polipeptido intestinal vasoativo (ou VIP) no plasma, molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) no plasma, pepsinogénio I e II no soro, cálcio ionizado no soro, Proteína Fixadora de Retinol (ou RBP) no plasma, resistina no plasma, óxido nítrico no plasma, cAMP no plasma, vitamina B<sub>3</sub> no soro, vitamina B<sub>5</sub> no soro e vitamina B<sub>6</sub> no soro, beta-endorfina no plasma, bradicinina no plasma, kanamicina no soro, atividade hemolítica do complemento CH<sub>50</sub> no soro, atividade hemolítica do complemento CH<sub>100</sub> no soro, fração C<sub>3a</sub> ativadora do complemento, fração C<sub>3b</sub> inativadora do complemento, fração iC<sub>3b</sub> do complemento, fração SC<sub>5b9</sub> do complemento, histamina no plasma, leucotrieno B<sub>4</sub> no plasma, mieloperoxidase no soro, neurotrofina BDNF no plasma, tromboxano B<sub>2</sub> no plasma, ac anti-*Coccidioides immitis*, Ac anti-*Fasciola hepática*, ac. anti-histioplasma no LCR e no soro, ac anti-*Paracoccidioides braziliensis* no soro, ac anti-*Sporothrix schenckii* no soro, ac anti-*Strongyloides stercoralis*, ac anti-*Toxocara canis* no soro, ac anti-*Trypanosoma cruzi*, no soro. Muitos destes parâmetros exigem estas condições não só para assegurar a integridade da amostra, mas também porque a técnica não é realizada todos os dias e por isso, tem de esperar por um número X de amostras para fazer uma série, o que pode implicar até uma semana de espera. Como a necessidade de congelação do soro ou plasma não depende em todos os casos do analito a detectar / quantificar mas também da técnica implementada, estas condições podem variar de laboratório para laboratório (ao contrário por exemplo dos cuidados a ter com amostras fotosensíveis). No entanto este tipo de amostras requer que todos os laboratórios e postos de colheitas estejam equipados com centrífuga e congelador a -20°C.

No caso da Serotonina no soro é necessário centrifugar no mínimo a 4000rpm durante 15 minutos e congelar. Este parâmetro (tal como os dois pontos anteriores) requer a existência de uma centrífuga adequada em todos os laboratórios e postos da colheita.

Quanto à Melatonina na Saliva, o MC indica não ingerir no dia da colheita café, bebidas alcoólicas, bebidas com corantes artificiais (ex.: refrigerantes), bananas. Não lavar os dentes com ou sem pasta dentífrica, durante o período da colheita. Lavar a boca com água 15 minutos antes da colheita da saliva. No MC nada é referido quanto ao horário de colheita, que deverá ser durante a noite, perto das 3 da manhã, hora em que esta hormona atinge o seu pico.

No caso do Cortisol, a colheita deve ser efetuada no seu pico, as 8 da manhã e às 16H quando o valor já tiver baixado. Nestas determinações deve-se dar especial atenção aos utentes que trabalhem por turnos.

No caso do potencial antioxidante total, é necessário centrifugar a amostra de imediato após a colheita e congelar a  $-70^{\circ}\text{C}$ . É uma análise pedida muito raramente, mas no caso de ser pedida, a solução que pode passar por encaminhar o utente para o laboratório central onde é feita a colheita.

No caso das hormonas influenciadas pelo ortostatismo como renina ativa no plasma, angiotensina II e aldosterona o doente deve permanecer deitado 2h (mínimo), se a colheita for prescrita em decúbito.

Para a quantificação das hormonas ADH, arginina vasopressina e vasopressina é necessário o repouso prévio de 1h antes da colheita.

Os exames microbiológicos que requerem o exame a fresco têm condições especiais de transporte e acomodação até ser feita a observação, por exemplo o exsudado vaginal requer transporte imediato e colocação na estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  para manutenção da mobilidade de eventuais *Trichomonas vaginalis* presentes na amostra, assim como a amostra para espermograma que deve ser mantida na estufa durante uma hora para liquefazer a amostra até ser feita a observação.

Por outro lado no exame microbiológico do LCR é necessário levar de imediato a amostra ao Laboratório à temperatura ambiente.

Estes e outros cuidados fazem da etapa pré-analítica uma etapa crítica para todo o processo. O técnico de colheitas quando tem diante de si o doente para realizar uma punção venosa ou outro exame, além de dever criar com este uma comunicação positiva e transmitir confiança, tem de confirmar a identidade do utente, efetuar a garrotagem, escolher a veia e realizar a punção de forma eficiente e rápida. Se a colheita for feita por vácuo, há que avaliar se a veia em questão tem débito suficiente e não irá colapsar (vulgo “abrir”) quando for aplicado o tubo em vácuo, caso se preveja que isso possa acontecer, é necessário recorrer ao sistema convencional de agulha e seringa. As veias mais difíceis são geralmente as das crianças, dos idosos, pessoas obesas ou muito sedentárias (com reduzida massa muscular e veias muito finas). Durante o meu estágio encontrei veias de calibre muito fino e veias “dançarinas” isto é que deslizam sobre a pele no momento da punção, tornando-a num ato difícil mesmo para profissionais experientes. Os casos mais difíceis que encontrei foram os doentes com patologias da coagulação, a fazer terapêutica anti-coagulante ou com quimioterapia em curso ou recente. Alguns destes doentes apresentam nos braços hematomas de colheitas anteriores ou que resultam do contacto com objetos no dia a dia. Nestes casos opta-se quase exclusivamente pelo sistema convencional de agulha e seringa e por vezes é necessário recorrer a veias localizadas nas costas da mão ou do pé. Um outro caso são os toxicodependentes que utilizam drogas injetáveis. Durante o estágio, encontrei apenas um caso com estas características e tinha as veias dos braços muito deterioradas. O técnico de colheitas sobretudo se pouco experiente, deve moderar a sua autoconfiança com a consciência de que deve chamar um colega mais experiente, quando as condições da colheita assim o exigiam.

A par de todos estes cuidados que há a ter no ato da colheita, há que saber exatamente que amostras são necessárias para o painel de análises pedido e como as processar, para evitar de chamar o utente ao laboratório para repetir uma colheita. Felizmente os sistemas informáticos permitem hoje imprimir a ficha do utente que é geralmente anexa à credencial. Nesta ficha são colocados todos os analitos e à frente de cada um o tipo de amostra e condições especiais como “proteger da luz” ou “tubo seco tratado com ácido nítrico”. A par destas indicações todos os laboratórios possuem um manual de colheitas que descreve as condições de colheita para cada parâmetro. O manual de colheitas pode divergir de

laboratório para laboratório porque para um dado parâmetro, cada método e cada bula podem ter exigências diferentes quanto ao tipo de amostra e conservação. Assim as condições descritas nos parágrafos anteriores baseiam-se no manual de colheitas do Laboratório Dr. Joaquim Chaves, versão 2009, que consultei durante o meu estágio.

### **Preparação das amostras para HPLC**

Durante o período de estágio na área de Química Analítica do Laboratório Dr. Joaquim Chaves, pude contactar com a preparação de amostras de urina e soro necessárias à execução das técnicas de HPLC. A rotina de trabalho é sempre a mesma: temos entre 30 a 40 amostras de urina acidificada que são conservadas congeladas até à altura da execução da análise. Para cada amostra é medido e anotado o volume de 24H. À área analítica chegam apenas alíquotas com os volumes indicados no MC para cada análise de 10mL, 20mL ou outros.

Por cada corrida são utilizados um calibrador e dois controlos (um normal e um patológico). A todas as amostras, calibrador e controlos é adicionada uma quantidade fixa de calibrador interno, que sofre todos os passos de extração e purificação da amostra. No caso das catecolaminas urinárias, as amostras são lavadas várias vezes na coluna de extração com um reagente de lavagem e diluição (reagente 1). A eluição da coluna faz-se com ácido bórico e é ainda adicionado um outro reagente ácido que estabiliza a amostra. A aplicação de 30 a 40 amostras no HPLC é feita com a ajuda de um autosampler. Entre duas injeções consecutivas, deve existir o tempo necessário para reter e eluir toda a amostra da coluna e do detetor de forma a estabilizar o cromatograma até à linha de base.

### **Conclusões**

Durante o meu estágio nos setores de Bioquímica do Labomarques e do Laboratório central Dr. Joaquim Chaves pude contactar com vários equipamentos e técnicas e com as condições de colheita para cada parâmetro. Dediquei algum tempo às técnicas preparativas no setor de Química Analítica do Laboratório Dr. Joaquim Chaves e dei sobretudo atenção ao controlo de qualidade interno e externo e ao tratamento dos seus resultados.

## Bibliografia

- Arantes-Gonçalves, F. et al. À procura de marcadores biológicos no comportamento suicidário. *Acta Med Port* 2008; 21: 89-98
- Bellet, S. et al. Effect of coffee ingestion on catecholamine release. *Metabolism* 1969, 18, 288-91.
- Bio-Rad Laboratories Inc . VMA HVA 5-HIAA by HPLC test, Instruction Manual, 2007.
- Bio-Rad Laboratories Inc. p-Catecholamines by HPLC test, Instruction Manual. 2006.
- Brescia, V et al. Evaluation of Factitious Hyperkalemia in Hemolytic Samples: Impact of the Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration. *Labmedicine*, 2009; 40(4): 224-226
- Dimeski G et al, Correction and reporting of potassium results in haemolysed samples. *Ann Clin Biochem*. 2005 Mar;42(Pt 2): 119-23.
- Feldman JM, Lee EM. Serotonin content of foods: effect on urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid. *Am J Clin Nutr*. 1985; 42:639-43.
- Grahame-Smith, DG. The carcinoid syndrome. *Gut* 1970, 11, 189-192
- Heinemann, G. et al. The influence of different diets and smoking on the clinical chemical diagnosis of pheochromocytoma, neuroblastoma, and carcinoid syndrome. *Klin. Wochenschr*. 1981, 59, 1165-73.
- Jay D et al, Characterization and Mathematical Correction of Hemolysis Interference in Selected Hitachi 717 Assays, 1993, *Clin Chem* 39 (9): 1804-10
- Jones, BA et al. Chemistry specimen acceptability: a College of American Pathologists Q-Probes study of 453 laboratories. *Arch Pathol Lab Med*. 1997 Jan; 121(1): 19-26.
- Kema IP, Schellings AM, Meiborg G, Hoppenbrouwers CJ, Muskiet FA. Influence of a serotonin- and dopamine-rich diet on platelet serotonin content and urinary excretion of biogenic amines and their metabolites. *Clin Chem*. 1992 Sep; 38(9):1730-6.
- Lippi G et al, Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing, *Clin Chem Lab Med*. 2006 44 (3): 311–16.
- Nemenoff, CB et al. Role of Serotonin in the Pathophysiology of Depression: Focus on the
- Serotonin Transporter. *Clin. Chemistry*, 1994, 40/2, 288-95.
- Tagari PC, et al, Simplified Determination of Serotonin in Plasma by Liquid Chromatography
- with Electrochemical Detection, *Clin. Chem*. 1984, 30, 131-35.
- Waalkes TP, Sjoerdsma A, Creveling CR Weisabach H, Udenfriend S. Serotonin, norepinephrine, and related compounds in bananas. *Science* 1958; 127: 648-50.

- Westgard JO. Abuses, Misuses, and In-excuses for QC problems with “Westgard Rules”  
Tradução autorizada pelo autor consultada em <http://www.controllab.com.br/> a 01-02-2011
- Westgard JO. Best Practices for “Westgard Rules” Tradução autorizada pelo autor consultada em <http://www.controllab.com.br/> a 01-02-2011
- Westgard JO. Multirule and “Westgard Rules”: What are They? Tradução autorizada pelo autor consultada em <http://www.controllab.com.br/> a 01-02-2011
- Young, DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. *Clin. Chem.* 1972, 18(10) 1041-303

**Relatório de Estágio**  
**Valência de Hematologia**



## **Abreviaturas**

CHGM – Concentração de hemoglobina globular média.

HGM - Hemoglobina Globular Média

Ht - Hematócrito

RBC - Eritrócitos

SP – Sangue periférico

VGM - Volume Globular Médio

WCB - Leucócitos

## Introdução

Na valência de Hematologia, direcionei o meu estágio para o trabalho de bancada (colorações, técnicas), operação dos equipamentos, mas sobretudo para a observação de esfregaços de sangue periférico normais, com patologia das séries vermelha e branca. A observação cuidada da morfologia do sangue periférico pode direccionar o diagnóstico e permitir iniciar um tratamento mais cedo. Com o conhecimento cada vez mais vasto da patologia da série branca, das translocações características e dos marcadores que diferenciam cada entidade, o médico apoia-se cada vez mais na biologia molecular e na citometria de fluxo para a definição do diagnóstico e para o início da terapêutica, no entanto a morfologia do sangue periférico continua a ser essencial para orientar os estudos e assim racionalizar os custos.

Tal como a valência de Bioquímica, também a valência de Hematologia foi realizada parte no Laboratório Labomarques em Sintra e parte no Laboratório Dr. Joaquim Chaves em Mira-Flores, visto serem Laboratórios de diferente dimensão, o tipo de casos e as técnicas realizadas são forçosamente diferentes.

Durante o estágio das cerca de 150 lâminas de sangue periférico observadas, normais e com varias patologias, escolhi para este relatório 24 casos, que pelo interesse clínico ou pela peculiaridade, pensei serem dignos de referência. É claro que num estágio desta natureza e com esta duração, não é o estagiário que determina as patologias que vai encontrar e referir no seu relatório, mas a casuística dos utentes que utilizam o laboratório e as chamadas de atenção dos colegas que estão na validação dos resultados ou ao microscópio.

O formato caso clínico, pareceu-me o mais adequado para os reportar. A maior parte dos casos resumem-se a uma amostra, mas outros têm duas ou mais amostras. Para maior simplicidade, trato todos os resultados quer os obtidos no Labomarques quer no Laboratório Dr. Joaquim Chaves como um único conjunto e dispondo-os por uma ordem que me pareceu a mais natural: iniciar com a patologia da série vermelha, seguida da série branca e depois por casos peculiares. Dado que estamos em laboratórios de rotina em que cada análise corresponde a um pedido de um médico, apenas podemos recorrer aos resultados obtidos na rotina.

Para a maior parte das amostras reporto além dos resultados analíticos e de imagens de citogramas, também imagens de microscopia, obtidas por mim com auxílio de equipamento amador. O objetivo não é fazer um livro de consulta ou um Atlas, dado que essas publicações utilizam equipamentos muito mais sofisticados e partem de uma amostragem muito maior, o que permite ter uma escolha de imagens muito mais ampla. O meu objetivo é apenas elaborar um registo e uma evidência das minhas observações de microscopia e ilustrar as minhas descrições.

Na apresentação dos resultados analíticos, são omitidas as linhas de resultado em branco ou cujos resultados não têm relevância para o estudo em questão. Omito também as descrições das metodologias, quer dos equipamentos analíticos (em ambos os laboratórios os resultados foram obtidos em Advia 2120), quer das colorações de rotina de MayGrünvald Giemsa. Apenas são referidos e/ou descritos os métodos pouco usuais ou que para mim foram novos ao longo do estágio.

## Patologia da série vermelha

### 1º caso clínico

Trata-se de uma mulher de 37 anos (N.S.A.) de quem temos 3 amostras.

Na primeira e a terceira amostras é pedido hemograma de que são apresentados os resultados na tabela abaixo.

Na primeira de 12-03-2010 temos eritrócitos pequenos e hipocrômicos. O valor de Hemoglobina é também baixo. As reservas de Ferro (Ferritina) estão muito baixas, assim como o Ferro circulante.

A capacidade total de fixação e o transportador do Ferro (transferrina) estão aumentados. Todo este quadro indicia uma anemia ferropénica clara e bem estabelecida.

Tabela 3.1 – Caso N.S.A.

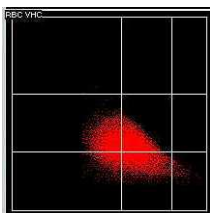


Figura 3.1 – Citograma RBC (Hemoglobina pelo Volume dos eritrócitos) da amostra de 12-03-2010 que apresenta a mancha característica da ferropénia.

	Data		
	Val. Referência	12-03-2010	20-04-2010
Eritrócitos (x10 <sup>12</sup> /L)	4,0–5,2	4,43	5,02
Hemoglobina (g/dL)	12–16	8,3	12,3
Hematócrito (%)	36–46	28,7	38,2
VGM (fL)	76–98	64,8	76,1
HGM (pg)	26–34	18,7	24,5
CHGM (Hb/Ht) (g/dL)	31–37	28,9	32,2
Índice disp. Eritrocitário (%)	11,5–15,0	14,6	20,2
Ferritina (µg/L)	10–120	5	16,5
Ferro Sérico (µg/dL)	60–180	27	102
Cap tot fix Fe (mg/dL)	220–400	609	445
Transferrina (mg/dL)	200–360	426	311
Reticulócitos (%)	0,2–2,1	0,97	0,7

O valor dos reticulócitos, sem ser muito alto, indicia que esta anemia é regenerativa.

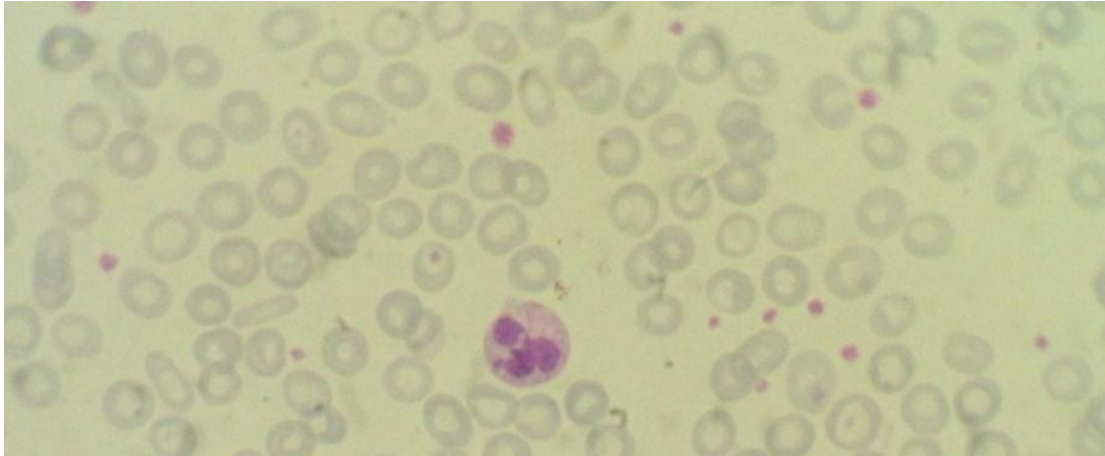


Figura 3.2 – Imagem obtida na amostra de 12-03-2010 é possível observar alguns eliptócitos, alguns eritrócitos ocos e uma hipocromia generalizada. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Na amostra obtida a 20-04-2010 já se nota uma franca recuperação para valores praticamente normais de hemoglobina e hematócrito, pelo que a causa é possivelmente uma toma de ferro que ocorreu entretanto.

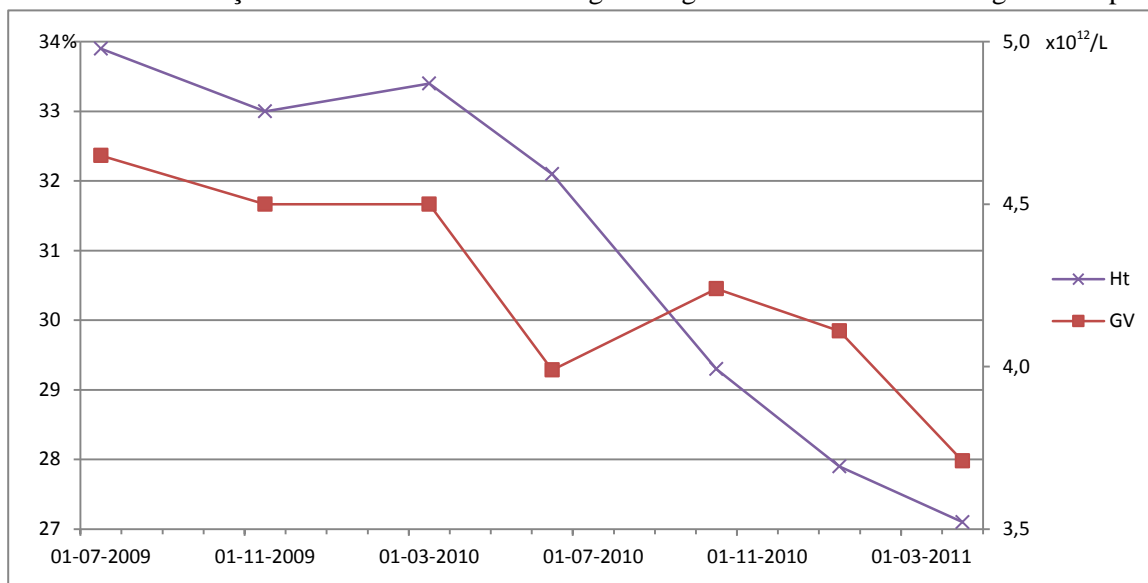
Entre estas duas amostras, o médico pediu ainda uma electroforese de hemoglobinas que obteve resultados normais ( $HbA_2=2,2\%$ ) e vitamina  $B_{12}$  e ácido fólico com resultados normais, excluindo assim outras patologias.

Escolhi este caso por ser uma ferropénia em que é possível observar rápida recuperação após adequado tratamento.

## 2º caso clínico

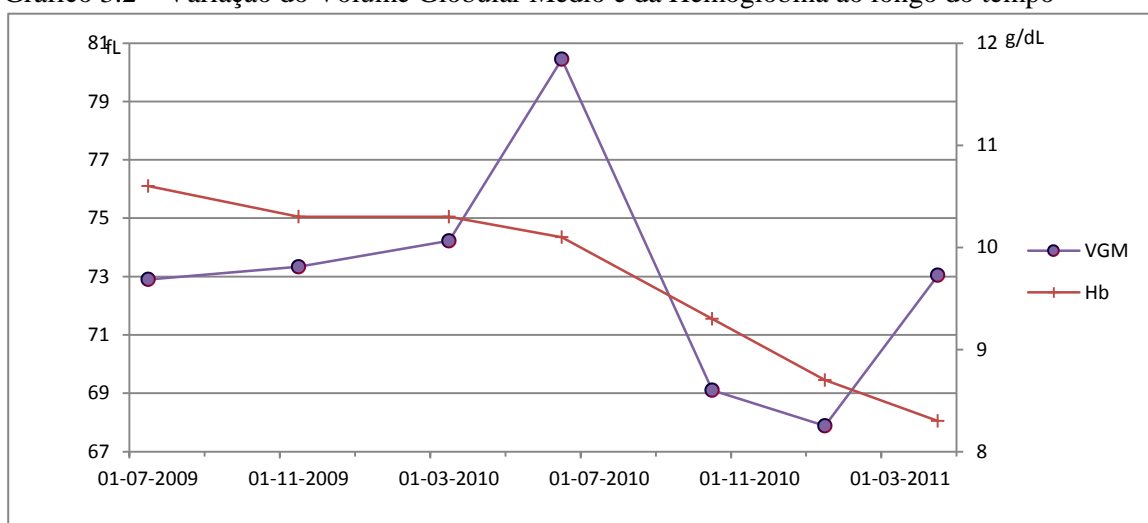
Trata-se de um homem de 87 anos (A.D.D.) que é assistido em regime domiciliário, acamado, diabético e com insuficiência renal. Os dados que recolhi correspondem a cerca de um ano e meio. São dados que permitem ter uma perspetiva da evolução da sua situação clínica e são reportados no apêndice I.

Gráfico 3.1 – Variação do Hematócrito e da contagem de glóbulos vermelhos ao longo do tempo.



Observa-se uma redução gradual da contagem de eritrócitos, assim como de hemoglobina, hematócrito e VGM.

Gráfico 3.2 – Variação do Volume Globular Médio e da Hemoglobina ao longo do tempo



Os depósitos de ferro estão sempre no mínimo com um valor de Ferritina a rondar os 20 $\mu$ g/L, excetuando uma determinação em que sobe aos 84 $\mu$ g/L que resultará eventual-

mente de uma toma de ferro de curta duração ou de alguma alteração na dieta. É interessante notar que na determinação seguinte, 2 meses após este valor, observa-se uma subida do VGM de 74,2 para 80,5fL e de HGM de 22,9 para 25,3pg. Fica a dúvida se a toma de ferro fosse mantida, a evolução do doente não poderia ser mais favorável, no entanto a toxicidade poderá ter desaconselhado a continuação da toma.

Gráfico 3.3 – Variação dos valores de ureia e ferritina ao longo do tempo

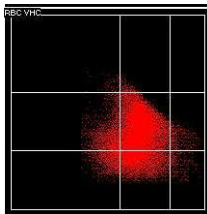
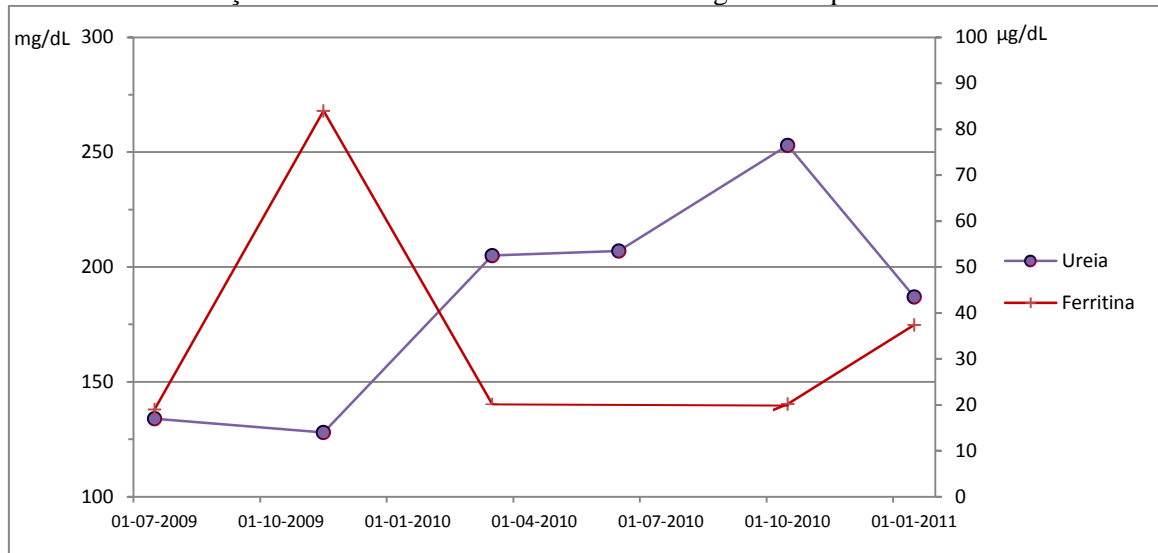


Figura 3.3 – Citograma RBC (Hemoglobina pelo Volume dos eritrócitos) da 3ª amostra deste estudo a 23-03-2010 em que é visível a anisocitose eritrócitária.

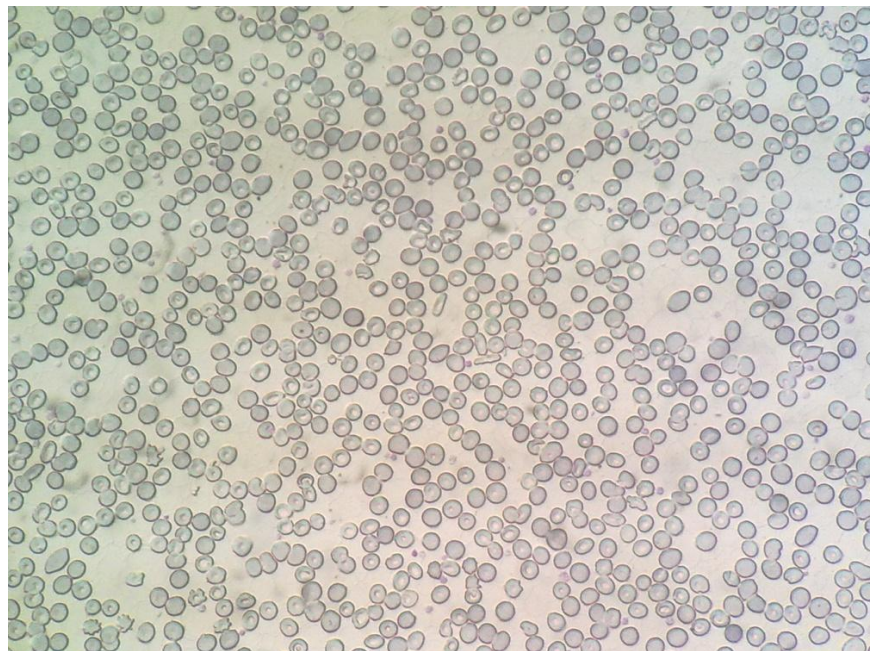


Figura 3.4 - Esfregaço obtido na 3ª amostra deste estudo, a 23-03-2010 evidência anisocitose (de resto já espectável pelo valor de 23,5 de índice de dispersão eritrocitário), anisocromia e eliptócitos. . Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

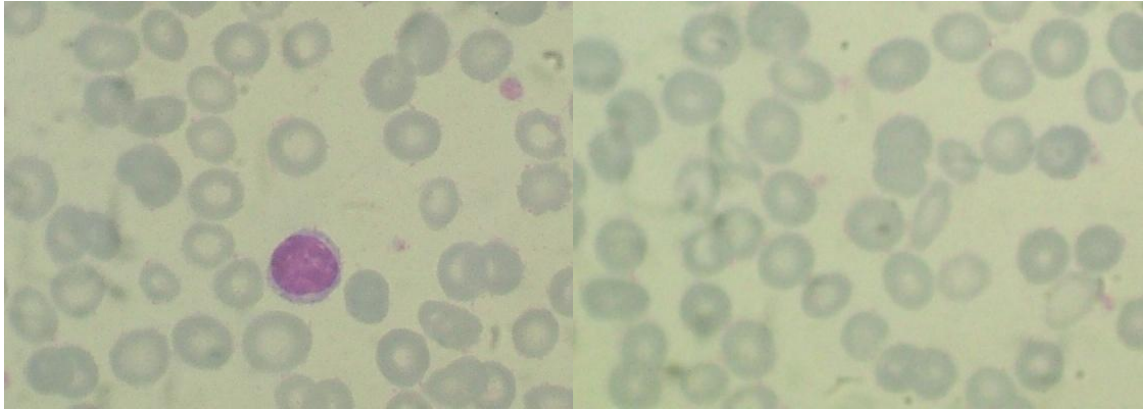


Figura 3.5 – Imagens obtidas na amostra de 23-03-2010 é possível observar anisocitose e a anisocromia. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

A existência desta dupla população pode ter várias causas: perda súbita de reservas de ferro por hemorragia, cirurgia ou outra, originando uma população hipocrômica, alteração de hábitos alimentares que permitem a produção de uma população de eritrócitos mais rica em hemoglobina ou transfusão (pouco provável).

Ao longo do estudo observa-se a subida dos valores de ureia, o que juntamente com os valores baixos de depuração da creatinina e os valores aumentados de ácido úrico atestam o quadro de insuficiência renal. Não temos contacto com a clínica nem sabemos se este utente foi suplementado com eritropoietina, mas a ausência de aplasia medular (que pode ser confirmada quer pelos resultados normais das séries megacariocítica e granulocítica, quer pela anisocromia), leva a admitir que o doente poderia ter resposta a um tratamento com eritropoietina e que neste caso não o terá tido.

Outro achado analítico deste caso é o crescente desequilíbrio hidroeletrólítico, com uma hiponatrémia cada vez mais acentuada, acompanhada, como é frequente, pela hipoclorémia. Dado que este desequilíbrio neste doente se manifesta gradualmente ao longo de meses, não é provável que tenha uma causa aguda (vómito, diarreia, sudorese intensa). Embora não tenhamos dados diretos sobre a volémia a osmolaridade do doente, o mais provável é que tenha origem na crescente insuficiência renal e na taxa de filtração glomerular diminuída, com retenção de água e perda gradual de sódio.

Por outro lado a existência no plasma de altas concentrações de solutos osmoticamente ativos, como a ureia, o ácido úrico e a creatinina, leva a que estes substituam gradualmente o sódio, levando a um quadro crítico. A correção destes valores tem de ser gradual



para evitar problemas neurológicos e pode passar pela ingestão de solutos com sal. O facto de se tratar de um doente de 87 anos e acamado questiona a possibilidade de intervenções mais invasivas como a hemodiálise e transplante renal.

Escolhi este caso por se tratar possivelmente de anemia ferropénica combinada com insuficiência renal sem tratamento ou com tratamento por algum motivo ineficaz ou não possível.

### 3º caso clínico

Trata-se de uma mulher de 68 anos (M.L.P.) que entre Janeiro de 2009 e Junho de 2011 utilizou os serviços do Labomarques com uma assiduidade aproximadamente mensal. Neste caso assistimos ao estabelecimento de uma anemia megaloblástica a partir de uma situação aparentemente normal. Os dados recolhidos em cerca de 30 amostras estão compilados no apêndice II.

Em resumo nas primeiras amostras a utente apresenta valores normais de contagem de eritrócitos ( $4.5 \times 10^{12}/L$ ), mas este valor desce até ( $2.7 \times 10^{12}/L$ ) em Março de 2010, mantendo-se baixo embora com oscilações até ao final do estudo.

Comportamento idêntico seguem o Hematócrito que desce dos 41% para os 33% e a Hemoglobina que desce dos 13,3 g/dL para os 10,9g/dL nas mesmas datas. Tendência inversa sofre o volume globular médio, que passa dos 90,7fL iniciais para os 129,7fL em Janeiro de 2011. Nos gráficos abaixo podemos ver a evolução destes dados no tempo.

Gráfico 3.4 – Variação do Hematócrito e da contagem de glóbulos vermelhos ao longo do tempo.

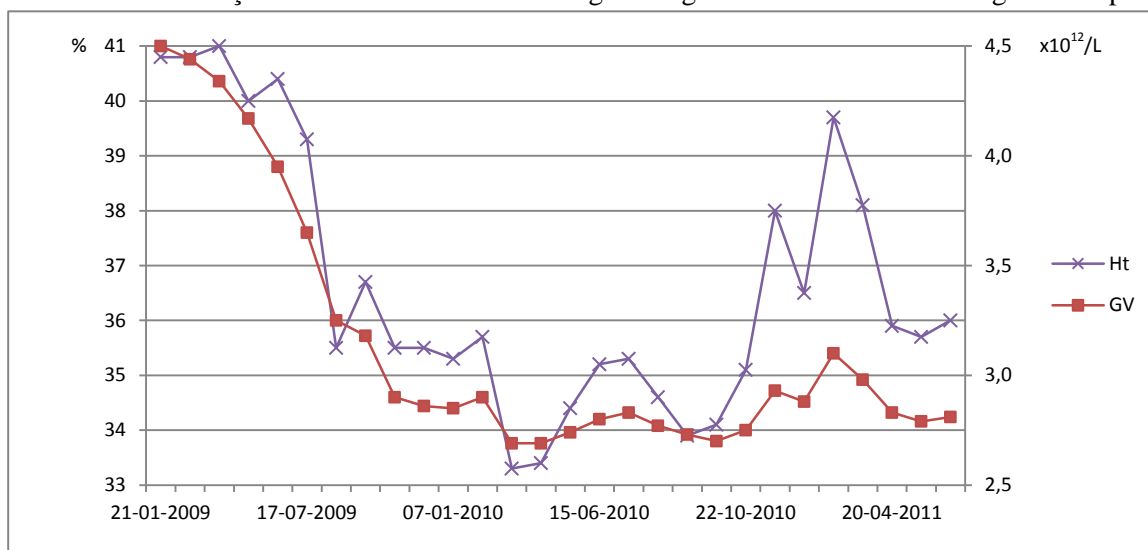
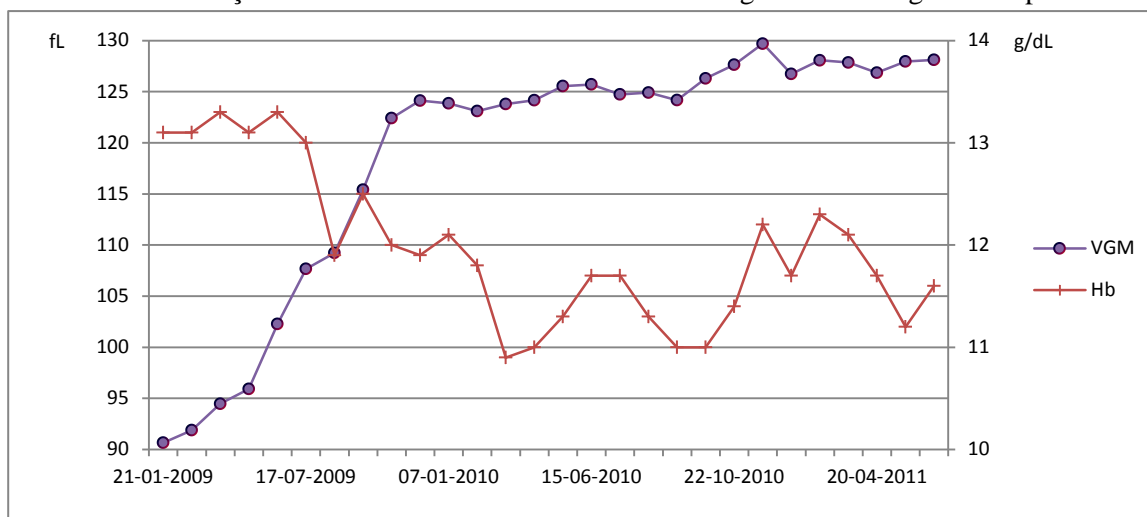


Gráfico 3.5 – Variação do Volume Globular Médio e da Hemoglobina ao longo do tempo.



A causas mais frequentes de macrocitose são a deficiência de Vitamina B<sub>12</sub> e/ou folatos, sobretudo se se observam alterações magaloblásticas no mielograma. A hipersegmentação dos neutrófilos pode confirmar o diagnóstico de carência de B<sub>12</sub> e/ou folatos. Outras causas que concorrem para macrocitose são a anemia hemolítica e a hemorragia, (geralmente caracterizadas por um aumento da contagem de reticulócitos). Outras causas de macrocitose podem ser hábitos alcoólicos, a utilização de drogas e/ou fármacos, a presença de doença hepática, de anemia aplástica,

O mielograma é uma análise que não é realizada no nosso laboratório e se a doente o realizou, nós não tivemos acesso aos seus resultados. No entanto, dado tratar-se de uma análise invasiva, dolorosa e não isenta de riscos, está reservada para as situações em que seja mesmo necessária a um diagnóstico diferencial.

Figura 3.6 – Nas imagens ao lado (amostra de 22-03-2010) é evidente um considerável desvio à direita. Após ter percorrido várias vezes esta lâmina, assim como a lâmina de 09-04-2010, não detetei quaisquer neutrófilos com seis lóbulos nucleares, que são patognômicos de carência de B<sub>12</sub> e/ou Folatos. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

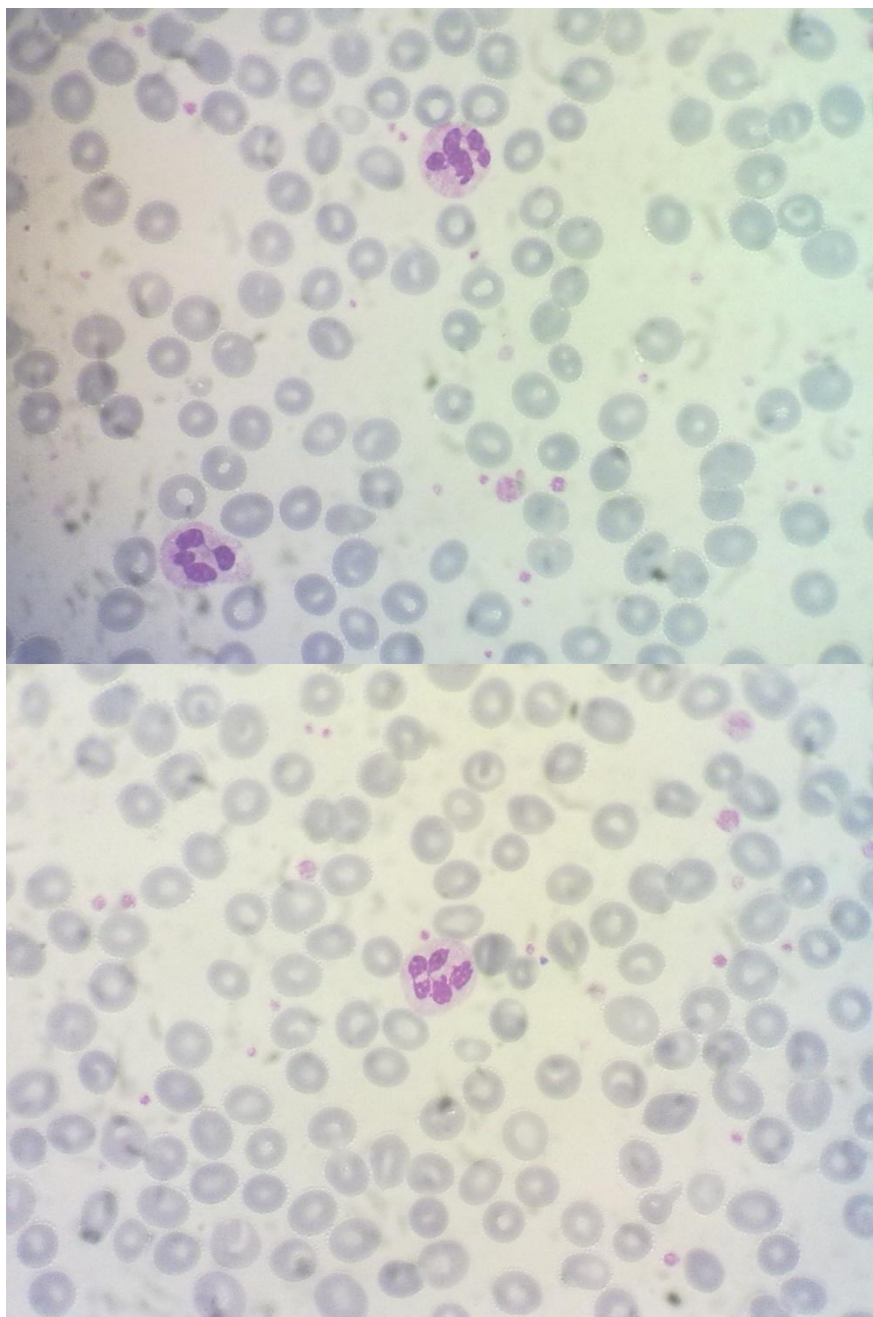
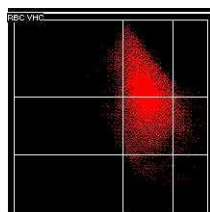


Figura 3.7 – A macrocitose é bem visível no citograma RBC abaixo que apresenta concentração de Hemoglobina pelo Volume dos eritrócitos obtido com a mesma amostra de 22-03-2010.



Por outro lado na tabela abaixo juntamente com os resultados das contagens de eritrócitos, hemoglobina e VGM, são reportados os resultados relacionados com a carência de B<sub>12</sub> e/ou folatos. Os valores altos de vitamina B<sub>12</sub> e folatos e os valores baixos de homocisteína dificilmente são compatíveis com uma situação de carência de B<sub>12</sub> e/ou folatos. Para além do mais, nestas 4 amostras, embora os níveis de B<sub>12</sub> e folatos séricos sejam altos, o VGM continua a aumentar, o que reforça a não existência de causalidade entre uma possível carência e esta macrocitose.

Tabela 3.2 – Caso M.L.P.

	Val. Referência \ Data	08-05-2010	30-07-2010	17-02-2011	04-04-2011
Eritrócitos (x10 <sup>12</sup> /L)	4,0–5,2	2,74	2,77	2,88	2,98
Hb (g/dL)	12–16	11,3	11,3	11,7	12,1
VGM (fL)	76–98	125,5	124,9	126,7	127,9
Vitamina B <sub>12</sub> (ng/L)	>273	442	318	393	405
Ácido Fólico (µg/L)	>3,3	16,5	15,1	6,8	7,6
Homocisteína (mg/L)	<2,3	–	–	–	0,86

Embora a ferropénia não seja causa de macrocitose, a sua investigação não deve ser excluída se houver a suspeita que as duas condições possam cursar em simultâneo, na sequência, por exemplo de uma hemorragia prolongada.

Ao longo do estudo foram pedidos vários marcadores para avaliar as reservas de Ferro, e os resultados de Ferritina no quadro abaixo excluem essa condição.

Tabela 3.3 – Caso M.L.P.

	Val. Referência \ Data	08-05-2010	30-07-2010	17-02-2011
Eritrócitos (x10 <sup>12</sup> /L)	4,0–5,2	2,74	2,77	2,88
Hb (g/dL)	12–16	11,3	11,3	11,7
VGM (fL)	76–98	125,5	124,9	126,7
Ferro Sérico (µg/dL)	60–180	–	–	114
Ferritina (µg/L)	10–120 <sup>1</sup>	85	97,6	–

Embora a insuficiência renal não esteja entre as causas de macrocitose, os valores baixos<sup>2</sup> de ureia sérica afastam a hipótese de produção insuficiente de eritropoietina.

<sup>1</sup> O valor de referência apresentado refere-se à determinação de 08-05-2010. Devido a uma mudança de técnica que ocorreu entretanto, na determinação de 30-07-2010 o valor de referência é [10, 270] µg/L. Optou-se por indicar aqui este dado para não sobrecarregar o quadro.

<sup>2</sup> Valores de 47mg/dL e de 36mg/dL respectivamente em 19-07-2010 e em 04-04-2011, sendo a normalidade <50mg/dL.

Percorrendo os resultados laboratoriais salta à vista uma elevação consistente da LDH, que é um marcador inespecífico para lesão de vários tipos de células, entre elas os eritrócitos (quando há hemólise), hepatócitos (no caso de patologia hepática, alcoolismo), células cardíacas (no caso do enfarte agudo do miocárdio), células musculares (no caso da rabdomiólise). A LDH também pode estar elevada em diversos tipos de tumores, no hipotireoidismo e em algumas infeções pulmonares.

Tabela 3.4 – Caso M.L.P.

	Val. Referência	08-05-2010	30-07-2010	14-01-2011	20-04-2011
LDH (U/L)	<248 <sup>1</sup>	316	559	629	678

O facto de a PCR estar sempre muito baixa quando é pedida<sup>2</sup>, assim como a ausência de neutrofilia excluem uma causa infecciosa para esta macrocitose.

No caso de haver suspeita de hemólise, a determinação da bilirrubina poderia excluir ou confirmar a suspeita, mas essa análise não foi pedida em nenhum dos processos. A presença icterícia na paciente ou de soro ictérico dificilmente teriam escapado sem notificação após 30 colheitas e 30 amostras, por isso é pouco provável que essa condição esteja presente.

Os resultados normais para as transaminases (TGO, TGP e GGT) obtidos em várias determinações<sup>3</sup> excluem patologia hepática, assim como macrocitose secundária ao alcoolismo.

Os resultados obtidos não são compatíveis com aplasia medular. Para que tal cenário fosse possível era necessária uma supressão das 3 linhagens, o que não acontece nem com a linhagem granulocítica nem com a linhagem megacariocítica.

Pela observação dos vários processos deste caso ficamos a saber os vários fármacos que M.L.P. está a tomar e portanto podemos ter mais pistas sobre a(s) patologia(s) em curso ou justificações para valores analíticos alterados. Sabemos assim que toma Levotiroxina

<sup>1</sup> O valor de referência apresentado refere-se à determinação de 08-05-2010. Devido a uma mudança de técnica que ocorreu entretanto, as determinações seguintes (30-07-2010, 14-01-2011 e 20-04-2011) o valor de referência é <480U/L. Optou-se por indicar aqui este dado para não sobrecarregar o quadro.

<sup>2</sup> Determinações negativas a 30-07-2010, 04-04-2011 e 30-05-2011.

<sup>3</sup> 17-07-2009, 30-07-2010, 14-01-2011 e 04-04-2011

(Eutirox), um beta bloqueante (Norvasc), um inibidor da enzima conversora da angiotensina (Coversyl), toma também uma estatina (Pravacol), Calcio e um ansiolítico (Lexotan).

O Eutirox é substituto sintético da hormona tiroideia, tiroxina ou T4 e é um fármaco utilizado no tratamento do hipotiroidismo assim como supressor do crescimento tumoral em doentes com cancro da tiroide. Pode também ser utilizado no tratamento do bócio benigno, em doentes com uma função tiroideia normal e para evitar a recaída após a cirurgia do bócio. Um outro dado laboratorial que salta à vista é a oscilação dos valores de TSH ao longo do tempo, conforme o quadro seguinte.

Tabela 3.5 – Caso MLP

	Val. Referência	Data	30-04-2010	19-07-2010	04-10-2010	04-04-2011	20-04-2011	30-05-2011
TSH (mUI/L)	0,35–5,5 <sup>1</sup>		8,22	0,28	0,55	32,6	26,5	3,7
T4 livre (ng/dL)	0,9–1,8 <sup>2</sup>		0,9	1,4	1,2	1,1	1,1	1,3

Com estes resultados e com os fármacos que está a tomar, ficamos a saber que M.L.P. é hipertensa, tem um hipotiroidismo acentuado (não sabemos se manteve a toma do Eutirox durante todo o período do estudo), e muito provavelmente a macrocitose que se observa é secundária ao hipotiroidismo, não podendo ser excluída a causa farmacológica.

Escolhi este caso para evidenciar que embora não seja uma causa predominante, o hipotiroidismo deve entrar no diagnóstico diferencial da macrocitose. Outro motivo que me levou a escolher este caso foi a grande quantidade de dados disponíveis.

<sup>1</sup> O valor de referência apresentado refere-se à determinação de 30-04-2010. Devido a uma mudança de técnica que ocorreu entretanto, as determinações seguintes (19-07-2010, 04-10-2010, 04-04-2011, 20-04-2011 e 30-05-2011) o valor de referência é [0,4–4,5] mUI/L. Optou-se por indicar aqui este dado para não sobrecarregar o quadro.

<sup>2</sup> O valor de referência apresentado refere-se à determinação de 30-04-2010. Devido a uma mudança de técnica que ocorreu entretanto, as determinações seguintes (19-07-2010, 04-10-2010, 04-04-2011, 20-04-2011 e 30-05-2011) o valor de referência é [0,8–2,7] ng/dL. Optou-se por indicar aqui este dado para não sobrecarregar o quadro.

#### 4º caso clínico

Trata-se de uma mulher de 61 anos, T.R.S. da qual temos muito poucos dados. Reporto aqui os dados disponíveis de apenas uma amostra. Trata-se de um caso raro no ambulatório dado que com uma pessoa com Hemoglobina de 4,8g/dL dificilmente se consegue deslocar ao laboratório. De facto a amostra tem origem numa instituição hospitalar convencionalizada com o Laboratório Dr. Joaquim Chaves.

É de notar a supressão das 3 linhagens, mas também é surpreendente a eritroblastose<sup>1</sup> que se reflete num aumento do VGM e do índice de dispersão eritrocitário.

Ao microscópio é bem visível a dupla população de células vermelhas e policromatofilia.

O HGM e o CHGM são normais, pelo que a acentuada baixa na Hemoglobina e no Hematócrito resulta da diminuição de eritrócitos circulantes.

Não são visíveis alterações na maturação das células da linhagem mielóide.

Tabela 3.6 – Caso T.R.S.		
	Val. Referência	Resultado
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	4,0–5,2	1,45
Hemoglobina (g/dL)	12–16	4,8
Hematócrito (%)	36–46	14,5
VGM (fL)	76–98	100,0
HGM (pg)	26–34	33,1
CHGM (g/dL)	31–37	33,1
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	25,5
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3,8–11,0	1,6
Neut. segmt (%)	35–70	60,1
Eosinófilos (%)	1–6	3,3
Basófilos (%)	0–2	0,7
Linfócitos (%)	20–45	27,3
Monócitos (%)	2–12	8,6
Eritroblastos em %		34,0
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu L$ )	130–400	79
Plaquetócrito (%)	0,15–0,42	0,07
Vol. plaquetário médio (fL)	7,0–11,0	9,0
Índice disp. Plaquetário (fL)	25,0–65,0	63,0

A leucopénia é tão severa que foi necessário percorrer a esfregaço quase todo ao microscópio para conseguir fazer a fórmula manualmente, havendo campos em que se encontram mais eritroblastos que leucócitos. Quanto às causas deste quadro, o mais provável é uma hemorragia grave. A possibilidade de falência medular não parece compatível com a eritroblastose observada, a menos que se tenha procedido a transplante de medula.

A possibilidade de utente com insuficiência renal com suplementação recente com eritropoietina não explicaria a supressão de todas as linhagens.

A possibilidade de tratamento com alguma droga ou quimioterápico não pode ser excluída. Outros cenários possíveis são hemólise grave ou pós-operatório.

O hiperesplenismo, a infecção por HIV e a Brucelose são outras causas de pancitopénia.

<sup>1</sup> Dado que muitos equipamentos contam os eritroblastos como leucócitos, o valor obtido tem de ser corrigido. Neste caso, o equipamento deu um resultado de  $2,14 \times 10^9/L$  leucócitos, mas como este valor corresponde a leucócitos+eritroblastos (134% dos leucócitos), aplicando a correcção ficamos com  $1,60 \times 10^9/L$ .



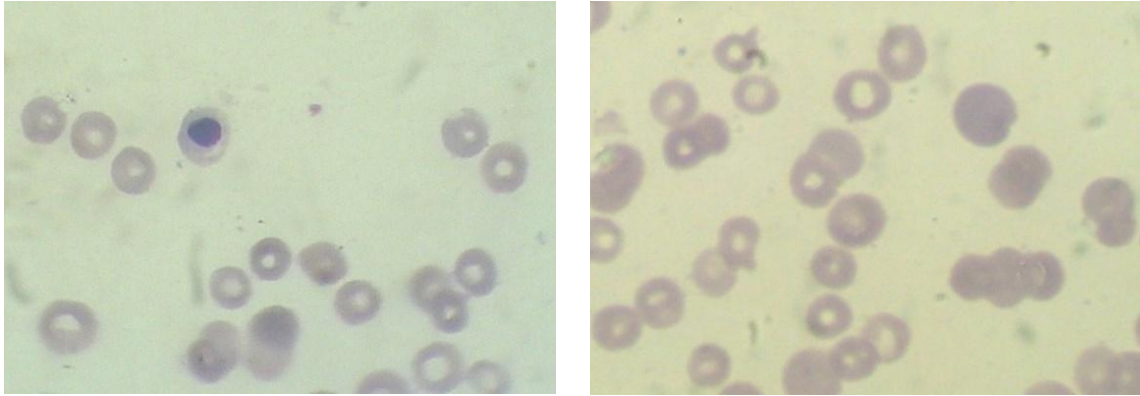


Figura 3.8 – Observa-se à esquerda um eritroblasto ortocromático e à direita um eritrócito policromatófilo. A anisocromia é evidente. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Escolhi este caso por ser o valor mais baixo que alguma vez encontrei em contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, pela supressão das três linhagens e pela elevada eritroblastose.

## 5º caso clínico

Trata-se de um homem de 41 anos, D.V.D., que apesar de ter uma hemoglobina de 13,7 g/dL apresenta eritrócitos microcíticos e alguns dacriócitos no esfregaço de sangue periférico.

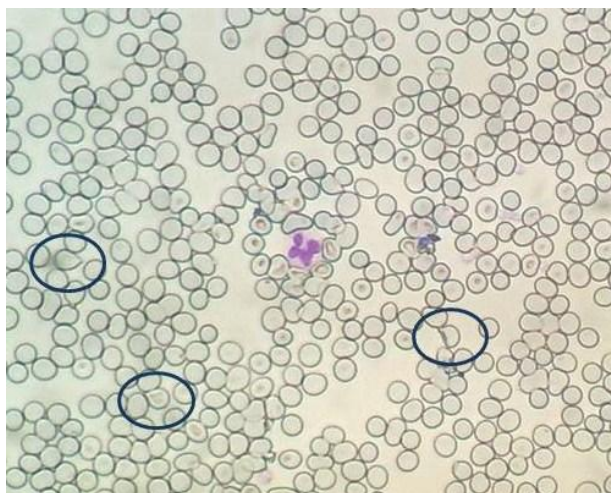
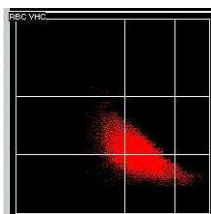


Figura 3.9 – Imagem com dacriócitos. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 400X.

Tabela 3.7 – Caso D.V.D.

	Val. Referência	Resultado
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	4,5–5, 9	6,86
Hemoglobina (g/dL)	13–17	13,7
Hematócrito (%)	41–53	44,8
VGM (fL)	76–98	65,3
HGM (pg)	26–34	20,0
CHGM (g/dL)	31–37	30,6
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	14,8
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3,8–11,0	8,5
Neut. Segmt. (%)	35–70	51,7
Eosinófilos (%)	1–6	2,9
Basófilos (%)	0–2	0,6
Linfócitos (%)	20–45	41,2
Monócitos (%)	2–12	3,6
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu L$ )	130–400	212
Plaquetócrito (%)	0,15–0,42	0,18
Vol plaquetário médio (fL)	7,0–11,0	8,4
Índice disp. Plaquetário (fL)	25,0–65,0	61,5
Índice de Mentzer (VGM/RBC)	>13 Ferropénia; <13 Talassémia	9,5

Uma análise mais detalhada do histórico do doente no sistema informático revelou que é portador de talassémia menor.



A aplicação do índice de Mentzer (quociente entre o VGM e a contagem de eritrócitos que permite diferenciar talassémia de ferropénia) confirmou esta informação.

Figura 3.10 – Citograma RBC (Hemoglobina pelo Volume dos eritrócitos) que apresenta a mancha característica de Talassémia.

Escolhi este caso por ser uma talassémia com alterações no esfregaço, valores normais de hemoglobina e também por se tratarem alterações do esfregaço que facilmente podem passar despercebidas ao olhar mais desatento.

6º caso clínico

Trata-se de uma mulher de 52 anos C.C.C., que apresenta um esfregaço de sangue periférico com microcitose, poiquilocitose, hipocromia e eliptócitos, como é visível na imagem abaixo. O valor de Hemoglobina é de 8,4g/dL.

Percorrendo o histórico no sistema informático ficamos a saber que a paciente tem Talassémia menor, mas o resultado do índice de Mentzer (15,8) aponta também para ferropénia.

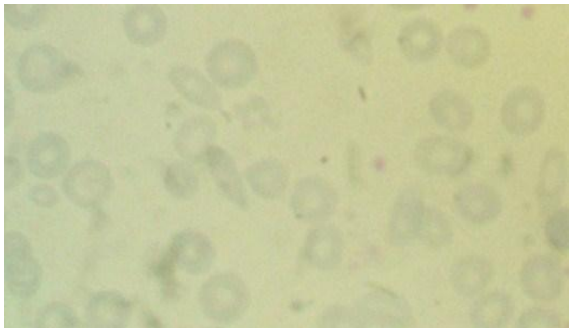


Figura 3.11 – Imagem de um esfregaço em que são visíveis a microcitose, poiquilocitose, hipocromia e eliptócitos. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Tabela 3.8 – Caso C.C.C.

	Val. Referência	Resultado
Eritrócitos (x10 <sup>12</sup> /L)	4,0–5,2	4,37
Hemoglobina (g/dL)	12–16	8,4
Hematócrito (%)	36–46	30,2
VGM (fL)	76–98	69,1
HGM (pg)	26–34	19,2
CHGM (g/dL)	31–37	27,8
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	18,3
WBC (x10 <sup>9</sup> /L)	3,8–11,0	3,9
Neut. Segmt. (%)	35–70	48,7
Eosinófilos (%)	1–6	6,6
Basófilos (%)	0–2	0,4
Linfócitos (%)	20–45	36,6
Monócitos (%)	2–12	7,6
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	130–400	384
Plaquetócrito (%)	0,15–0,42	0,26
Vol plaquetário médio (fL)	7,0–11,0	6,8
Índice disp. Plaquetário (fL)	25,0–65,0	35,8
Ferritina (μg/L)	20–250	5
Ferro Sérico (μg/dL)	70–180	21
Transferrina (mg/dL)	200–360	326
Índice de Mentzer (VGM/RBC)	>13 Ferropénia; <13 Talassémia	15,8

Neste mesmo processo temos um resultado muito baixo de ferritina (5μg/L) que confirma a ferropénia e sugere que neste caso temos uma talassémia associada a ferropénia.

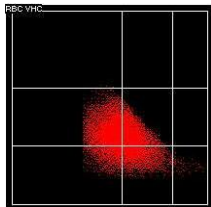


Figura 3.12 – Citograma RBC (Hemoglobina pelo Volume dos eritrócitos) que apresenta um grande deslocamento para o lado da hipocromia, e o seu aspeto é muito semelhante aos citogramas obtidos em situações de ferropénia.

A carência em ferro impede o habitual aumento da contagem de eritrócitos que é tão característico do doente com talassémia. A correcção da ferropénia no doente talassémico deve ser acompanhada pelo médico de forma a evitar a acumulação dos depósitos de ferro, sobretudo nos casos de talassémia maior.

Escolhi este caso por ser uma combinação de talassémia e ferropénia.

## 7º caso clínico

Trata-se de uma criança de 7 anos, I.M.L., do sexo masculino, que apresenta no esfregaço do sangue periférico (imagens abaixo com ampliação de 1000x) microcitose, algumas target-cells e alguns acantócitos.

Outros resultados obtidos com esta amostra são vitamina B<sub>12</sub> e folatos normais e electroforese de hemoglobinas com HbA<sub>2</sub> = 3,0%. Este valor de Hemoglobina A<sub>2</sub>, o valor ligeiramente aumentado da contagem de eritrócitos, a microcitose e o valor baixo de hemoglobina formam um quadro em que não é possível não suspeitar de talassémia minor.

De facto o índice de Mentzer confirma a suspeita com um valor de 11,9.

Tabela 3.9 – Caso I.M.L.

	Val. Referência	Resultado
Eritrócitos (x10 <sup>12</sup> /L)	3,2–5,4	5,41
Hemoglobina (g/dL)	9,5–15,0	10,7
Hematócrito (%)	29–45	34,8
VGM (fL)	74–95	64,3
HGM (pg)	23–32	19,8
CHGM (g/dL)	31–37	30,7
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	15,7
WBC (x10 <sup>9</sup> /L)	6–15	4,5
Neut segmt (%)	34–68	35,5
Eosinófilos (%)	2–8	7,6
Basófilos (%)	0–2	0,5
Linfócitos (%)	30–60	49,2
Monócitos (%)	3–13	7,2
Ferritina (µg/L)	16–119	12,9
Ferro Sérico (µg/dL)	36–184	47
Transferrina (mg/dL)	200–360	288
Índice de Mentzer (VGM/RBC)	>13 Ferropénia; <13 Talassémia	11,9

Neste caso há também uma ferropénia que se está a estabelecer como confirmado pelo resultado da ferritina.

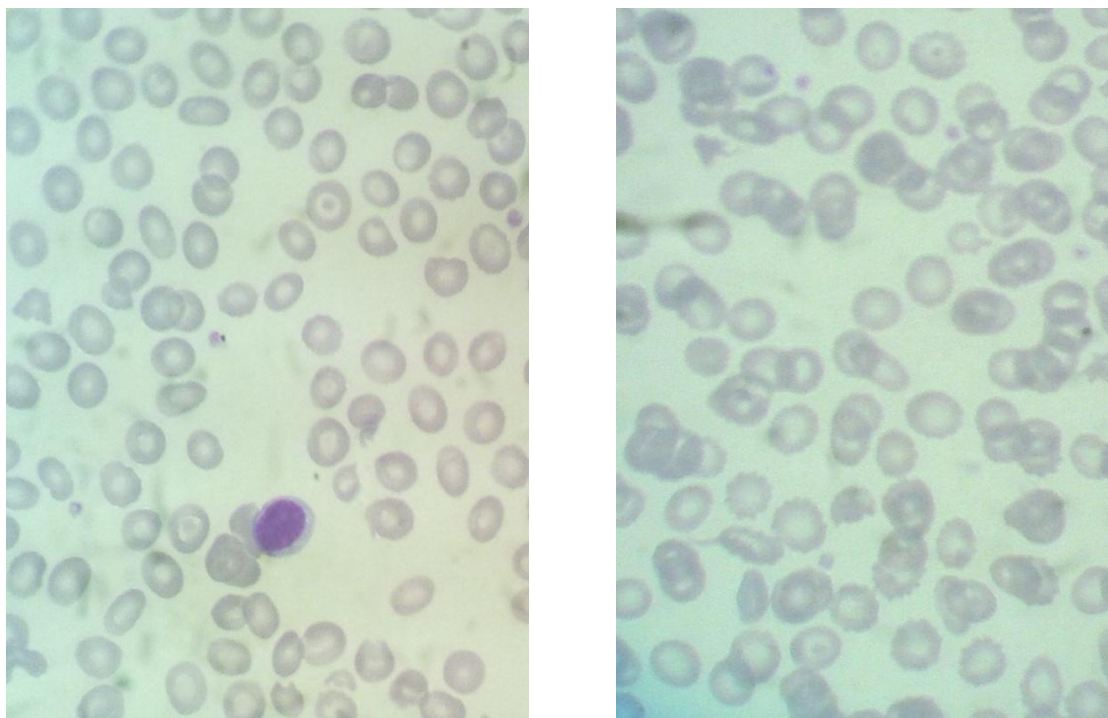


Figura 3.13 – Observam-se alguns eritrócitos ocos e hipocromia. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Este caso é muito semelhante ao anterior, mas decidi inclui-lo na mesma pelo facto de poder passar despercebido se não se vir o esfregaço e por ser observado numa criança. A detecção precoce da talassémia pode prevenir anemias e atrasos no crescimento, que são evitáveis.

## 8º caso clínico

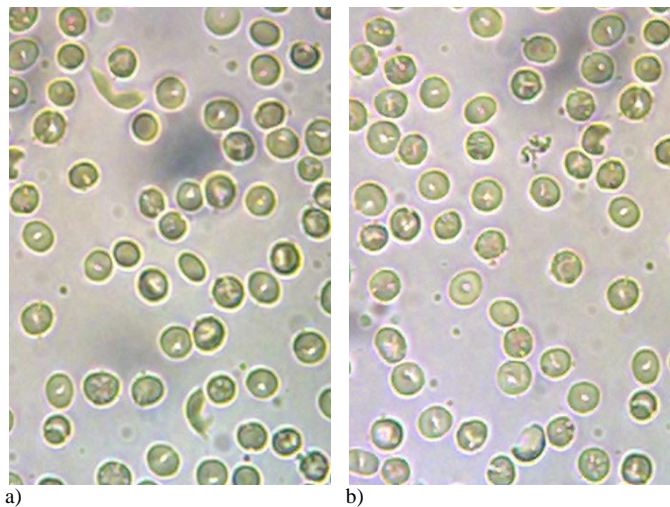
Incluo nesta sequência de casos clínicos, um para o qual foi pedida uma prova de falciformação. Temos poucos dados acerca de uma paciente S.E.E. de 32 anos com suspeita de ser portadora de uma hemoglobinopatia.

A prova de falciformação foi realizada em paralelo com um controlo normal, que no Laboratório Dr. Joaquim Chaves tem o nome de material de referência interno (MRAI).

A prova consistiu na incubação de na incubação de hemácias do caso S-E.E e do Material de referência interno, como controlo negativo em metabissulfito de sódio a 2%.

Figura 3.14 – a) Caso S.E.E. Observam-se alguns drepanócitos, que são patognomónicos de drepanocitose, resultantes da ação do agente redutor.

b) Material de referência interno, como controlo negativo. Não se observam células falciformes Ampliação de 400X



## Alterações benignas da linhagem mielóide

### 9º caso clínico

Trata-se de uma mulher de 26 anos, M.N.L., grávida em pré-termo sem patologia aparente. Os valores baixos de hemoglobina e hematócrito são normais nesta fase da gravidez dada a hemodiluição que resulta da maior volémia.

Também a leucocitose que se obtêm à custa da neutrofilia é normal neste estado fisiológico. De nota neste caso é a deficiência em mieloperoxidase, a enzima que é utilizada para identificar os granulócitos pelos sistemas automatizados.

Neste caso, o equipamento emitiu um alarme e o resultado da fórmula leucocitária é obtido manualmente ao microscópio.

Tabela 3.10 – Caso M.N.L.

	Val. Referência	Resultado
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	4,0–5,2	4,00
Hemoglobina (g/dL)	12–16	10,5
Hematócrito (%)	36–46	31,7
VGM (fL)	76–98	79,3
HGM (pg)	26–34	26,3
CHGM (g/dL)	31–37	33,1
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	12,4
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3,8–11,0	14,0
Neut. segmt. (%)	35–70	82,0
Eosinófilos (%)	1–6	3,0
Basófilos (%)	0–2	0,0
Linfócitos (%)	20–45	11,0
Monócitos (%)	2–12	4,0

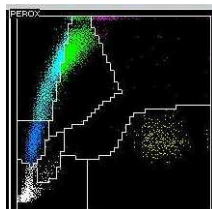


Figura 3.15 – Citograma de complexidade por actividade peroxidase, note-se a nuvem de pontos na região característica das células de grandes dimensões e com actividade peroxidase muito reduzida ou nula. São os granulócitos sem actividade peroxidase.

Os granulócitos deficientes em mieloperoxidase não têm qualquer característica morfológica que os distinga dos restantes na coloração de May-Grünwald-Giemsa.



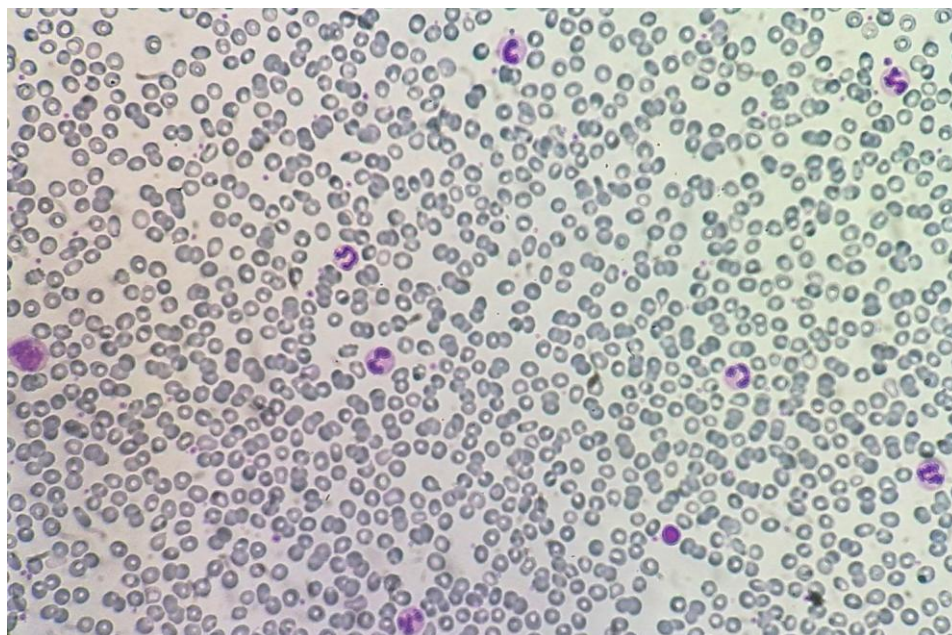
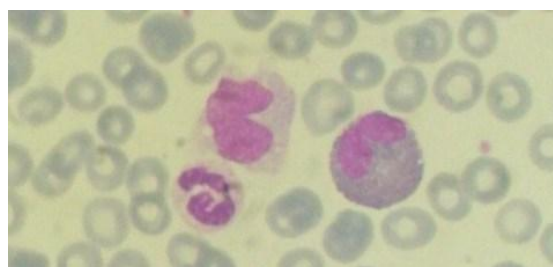


Figura 3.16 – A neutrofilia é desde logo evidente no voo da lâmina com amplificação de 400X. Coloração de May-Grünwald Giemsa.



Figura 3.17 – A neutrofilia é também evidente com amplificação de 1000X. Coloração de May-Grünwald Giemsa.

Figura 3.18 – Alguns dos leucócitos presentes na lâmina: da esquerda para a direita temos um neutrófilo, um monócito e um eosinófilo. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.



Escolhi este caso para ilustrar o Hemograma em duas situações fisiológicas, a gravidez e a deficiência em mieloperoxidase que existe na população com uma frequência de 1:2000 casos.



## 10º caso clínico

E.G.N. é um homem de 45 anos com redução dos indicadores da série vermelha, mas dado que não temos outros exames, nem informação clínica, não é possível avançar com uma hipótese diagnóstica para a causa.

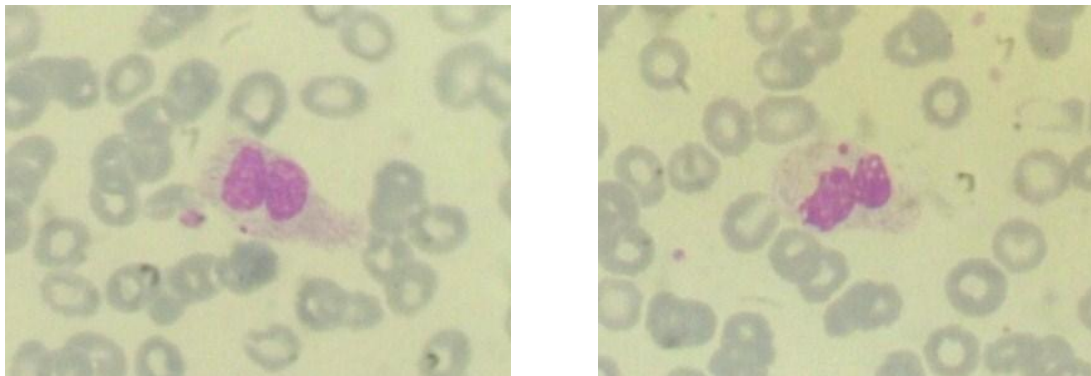


Figura 3.19 – O principal achado deste caso é o acentuado desvio à esquerda com muitos neutrófilos hiposegmentados, núcleos com dois lobos e formas sugestivas de Pelger-Huet. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

O Pelger-Huet é uma anomalia de transmissão autossômica dominante cuja causa é uma mutação em proteínas de membrana nuclear.

Os neutrófilos dos heterozigotos têm o núcleo bilobado e não apresentam perturbação da função, enquanto os homozigotos têm geralmente núcleo circular e podem ter problemas funcionais.

Outra entidade é o pseudo-Pelger-Huet que pode surgir após um tratamento de quimioterapia, no curso de uma leucemia mielóide crónica ou de um síndrome mielodisplásico, entre outros.

Tabela 3-11 – Caso E.G.N.

	Val. Referência	Resultado
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	4,5–5,9	3,90
Hemoglobina (g/dL)	13–17	10,8
Hematócrito (%)	41–53	34,1
VGM (fL)	76–98	87,4
HGM (pg)	26–34	27,7
CHGM (g/dL)	31–37	31,7
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	14,0
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3,8–11,0	3,6
Neut. banda /Heterófilos		3,0
Neut. Segmt. (%)	35–70	29,0
Eosinófilos (%)	1–6	19,0
Basófilos (%)	0–2	0,0
Linfócitos (%)	20–45	28,0
Monócitos (%)	2–12	21,0

Ao darmos a indicação “formas sugestivas de Pelger-Huet” estamos a dar ao clínico a possibilidade de confrontar esta nossa observação com os dados clínicos de que dispõe e outros exames complementares e assim valorizar ou não esta informação e tomar ou não uma atitude terapêutica.

Reportei este caso porque pode ser confundido com a presença de precursores mielóides no SP o que pode dar início a uma terapêutica errada e desnecessária.

## 11º caso clínico

L.P.D. é um homem de 56 anos e o motivo da sua inclusão nesta série de casos clínicos é o facto de ter uma notável eosinofilia. A eosinofilia pode dever-se a reação alérgica ou a infecção parasitária, mas valores de eosinofilia desta ordem de grandeza são quase exclusivamente causadas por infecções com parasitas internos ou externos.

A eosinofilia desaparece quando a infestação é debelada, sendo um bom indicador de cura.

Os valores de normais da série vermelha, assim como a ausência de leucocitose e de precursoras da série branca no SP permitem excluir uma neoplasia mieloide com eosinofilia.

Tabela 3.12 – Caso LPD

	Val. Referência	Resultado
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	4,5–5,9	5,31
Hemoglobina (g/dL)	13–17	15,4
Hematócrito (%)	41–53	45,7
VGM (fL)	76–98	86,1
HGM (pg)	26–34	29,0
CHGM (g/dL)	31–37	33,7
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	12,6
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3,8–11,0	7,9
Neut. Segmt. (%)	35–70	32,4
Eosinófilos (%)	1–6	25,9
Basófilos (%)	0–2	0,4
Linfócitos (%)	20–45	35,6
Monócitos (%)	2–12	5,7

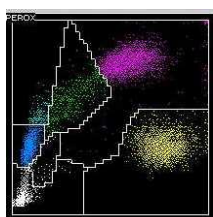


Figura 3.20 - No citograma de complexidade por atividade peroxidase note-se a nuvem de pontos na região característica dos eosinófilos.

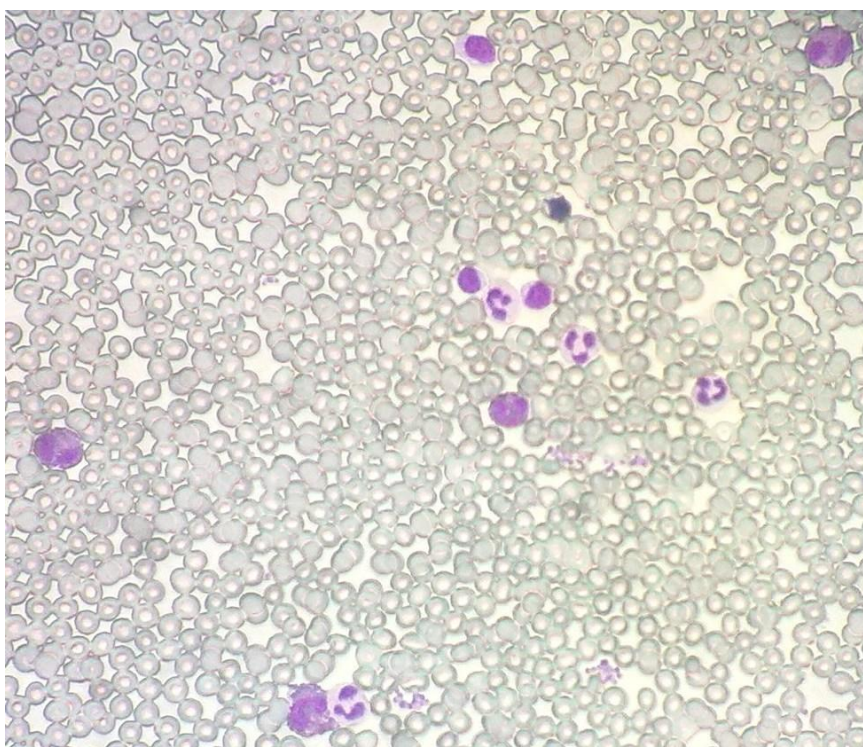


Figura 3.21 - A Eosinofilia é muito facilmente detetável, mesmo com uma ampliação de 400x, são visíveis 4 eosinófilos, 4 neutrófilos e 3 linfócitos. Coloração de May-Grünwald Giemsa.

Quando não se encontra uma causa reacional para uma eosinofilia persistente, é necessário suspeitar de leucemia mieloide eosinofílica.

Escolhi este caso por ser um achado relativamente frequente no Laboratório. Embora a sua identificação não levante geralmente problemas, eosinofilias desta ordem de grandeza são geralmente confirmadas por observação do esfregaço.

## Patologia da linhagem mieloide

### 12º caso clínico

Trata-se de uma mulher de 84 anos, F.S.G. que, a par de uma redução na contagem de vermelhos, hemoglobina e hematócrito e também na linhagem megacariocítica, apresenta em circulação blastos e mielócitos. A leucocitose é praticamente inexistente podendo resultar do tratamento ou exaustão da medula.

A trombocitopénia é muito accentuada e pode ser resultado quer das causas mencionadas anteriormente quer da infiltração da medula por um clone tumoral.

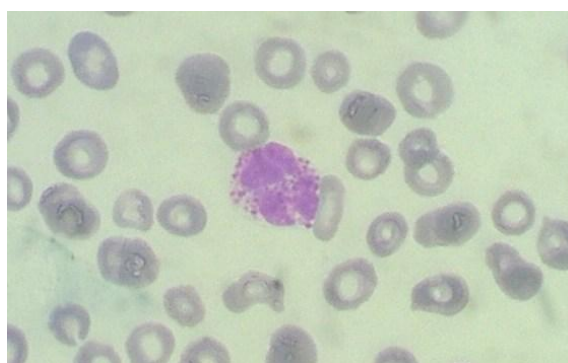
Trata-se de uma leucemia mieloide a basófilos, dado o valor alto de basófilos que se observa, quer em termos percentuais, quer em termos absolutos (valores em *itálico*,  $\times 10^9/L$ ), dado que se deve sempre suspeitar de valores de basófilos superiores a  $300 \times 10^6/L$ .

Tabela 3.13 - Caso F.S.G.

	Val. Referência	Resultado	
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	4,0–5,2	2,69	
Hemoglobina (g/dL)	12–16	8,4	
Hematócrito (%)	36–46	25,3	
VGM (fL)	76–98	94,1	
HGM (pg)	26–34	31,2	
CHGM (g/dL)	31–37	33,2	
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	25,1	
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3,8–11,0	12,7	
Neut. banda /Heterófilos			
Neut. segmt. (%)	35–70	32,0	<i>4,1</i>
Eosinófilos (%)	1–6	4,0	<i>0,5</i>
Basófilos (%)	0–2	8,0	<i>1,0</i>
Linfócitos (%)	20–45	44,0	<i>5,6</i>
Monócitos (%)	2–12	5,0	<i>0,6</i>
Mielócitos		4,0	
Blastos		3,0	
Eritroblastos em %		12	
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu L$ )	130–400	9	
Plaquetócrito (%)	0,15–0,42	0,01	
Vol. plaquetário médio (fL)	7,0–11,0	9,2	
Índice disp. Plaquetário (fL)	25,0–65,0	16,4	



a)



b)

Figura 3.22 – Nas imagens vemos dois basófilos característicos desta lâmina. a) forma mais imatura, com cromatina mais laxa e granulações secundárias menos evidentes do que em b). Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

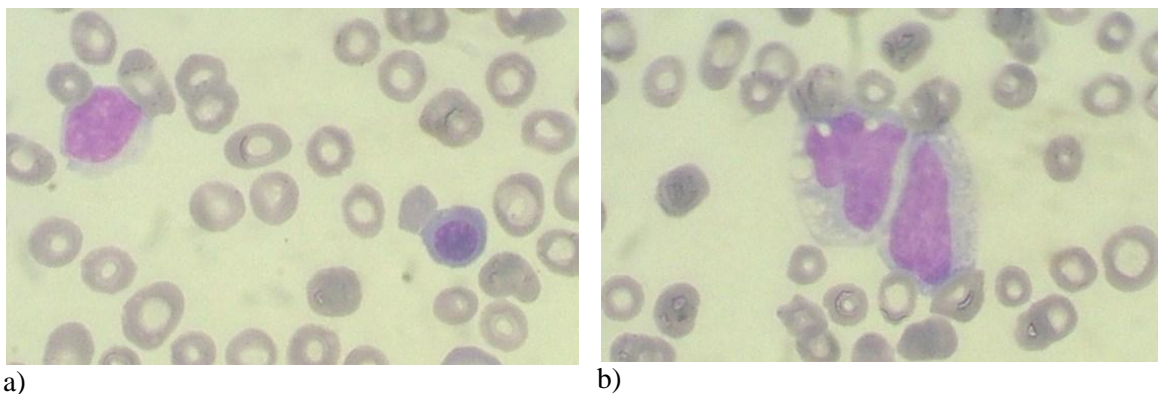


Figura 3.23 – a) um mielócito e um eritroblasto ortocromático; b) dois blastos. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

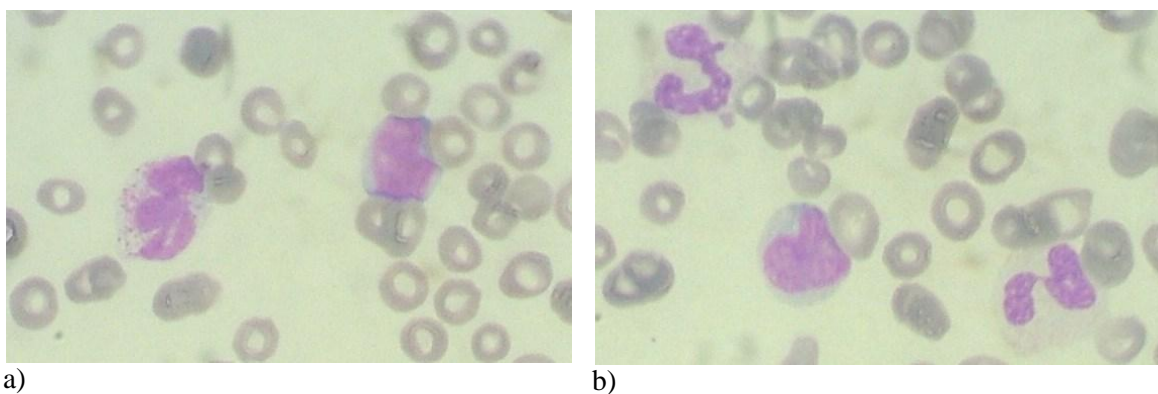


Figura 3.24 – a) um basófilo imaturo e um blasto; b) dois neutrófilos segmentados e um blasto. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Observa-se hipocromia e em quase todas as imagens é visível a anisocromia e a policromasia.

Escolhi este caso pelo grande interesse que tem o reconhecimento da LMC a basófilos no laboratório de hematologia.



### 13º caso clínico

Neste caso, de um homem com 42 anos, P.M.P., temos uma redução menos acentuada na série vermelha e temos a série megacariocítica preservada. No entanto temos uma leucocitose muito proeminente à custa de neutrofilia, em que estão presentes no sangue periférico todos os precursores desde o mieloblasto até ao neutrófilo em banda. Trata-se de uma lâmina muito interessante pela possibilidade de observar todos os precursores mielóides.

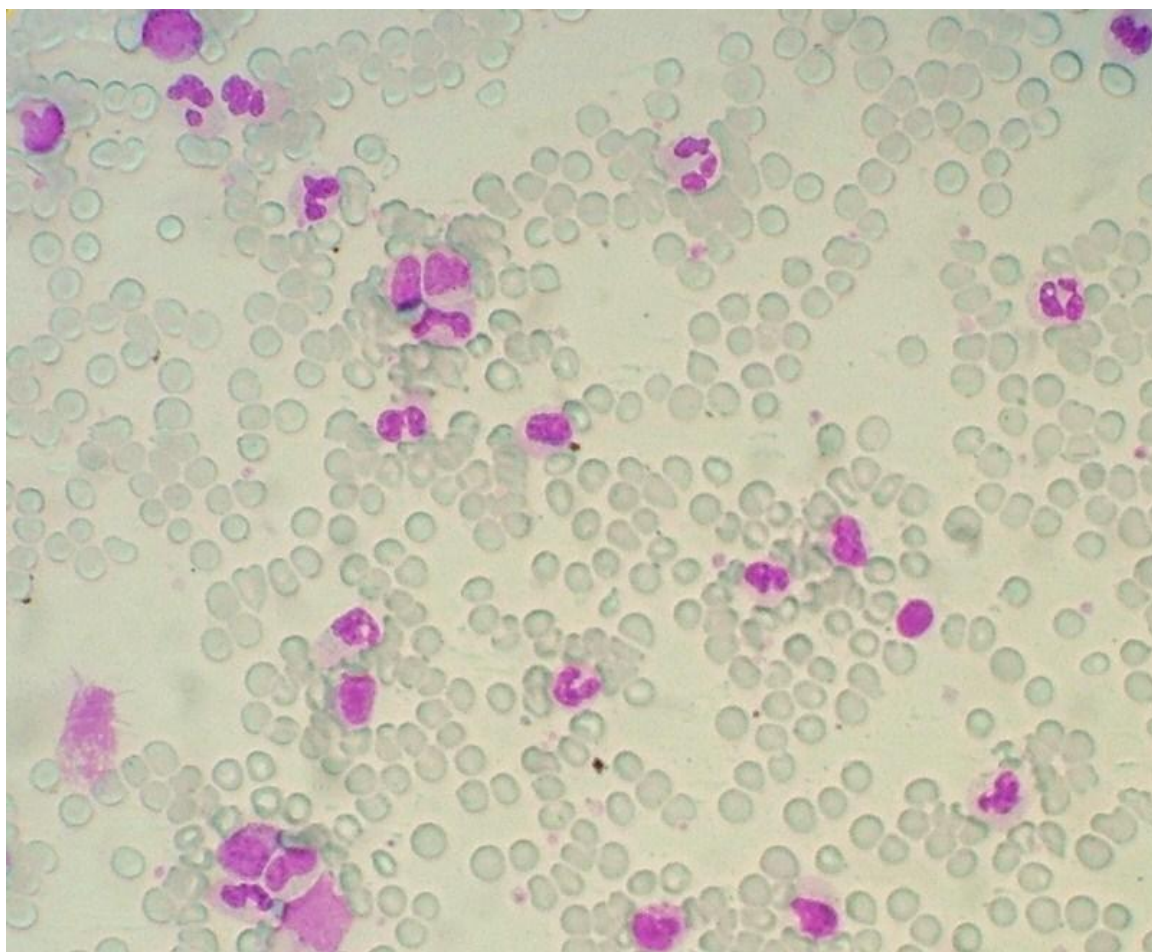


Figura 3.25 – A leucocitose e a neutrofilia são de imediato perceptíveis no voo da lâmina com a ampliação de 400x assim como a presença de formas imaturas com células de grandes dimensões e com cromatina laxa. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Neste trabalho esta é a única lâmina com promielócitos que foi corada no Labomarques, onde o protocolo de coloração de May-Grünwald-Giemsa é manual e permite evidenciar melhor a granulação primária.

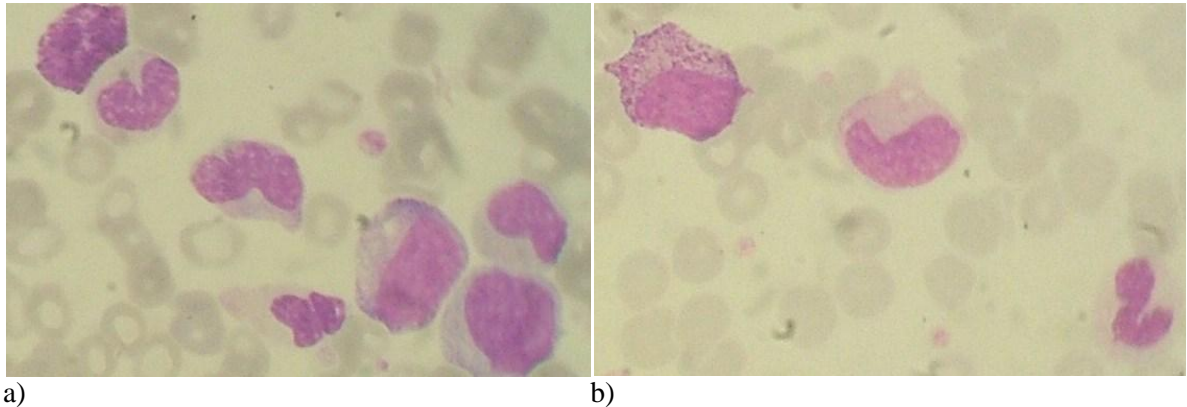


Figura 3.26 – a) a presença de mieloblastos é facilmente detetável no canto inferior direito da imagem; presentes também metamielócitos no centro da imagem. b) da esquerda para a direita, um promielócito, um metamielócito e um neutrófilo). Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Os promielócitos nesta lâmina são abundantes e exibem a característica granulação primária azurófila no citoplasma como na figura 3.26b).

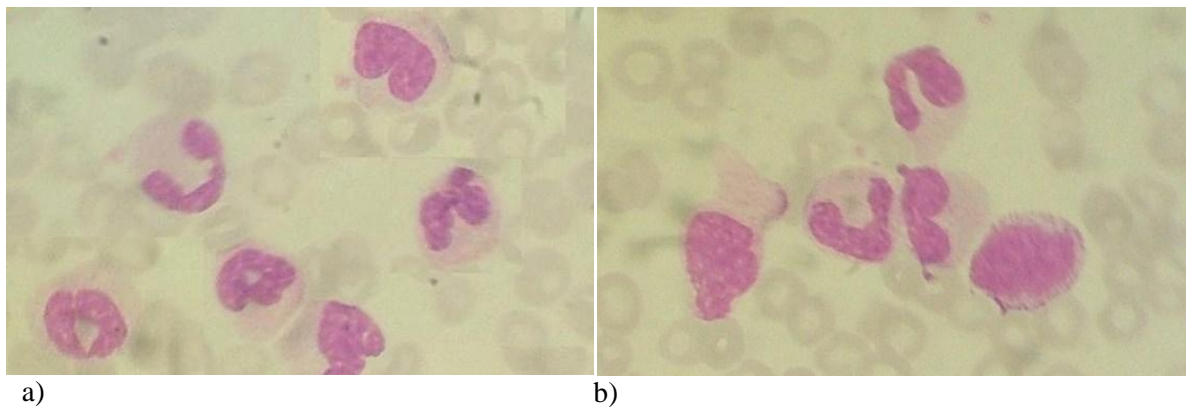


Figura 3.27 – a) a leucocitose e a neutrofilia são de imediato perceptíveis, com acentuado desvio à esquerda e numerosas formas em banda ou bastonetes; b) neutófilos hiposegmentados e um promielócito. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.



Figura 3.28 – agregado com um promielócito (do lado esquerdo em cima com granulação citoplasmática fina, um mielócito e 3 neutrófilos hiposegmentados). Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

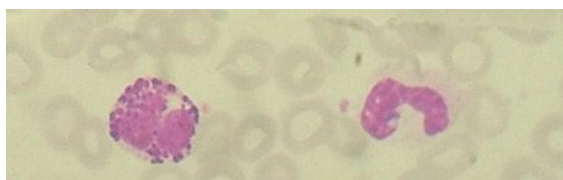


Figura 3.29 – Note-se à esquerda um basófilo com granulação secundária evidente e diferente da exibida pelos promielócitos. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Tabela 3.14 – Caso P.M.P.

	Val. Referência	Resultado
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	4,5–5,9	4,04
Hemoglobina (g/dL)	13–17	10,7
Hematócrito (%)	41–53	33,5
VGM (fL)	76–98	82,9
HGM (pg)	26–34	26,5
CHGM (g/dL)	31–37	31,9
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	16,6
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3,8–11,0	92,8
Neut. banda /Heterófilos		23,0
Neut. segmt. (%)	35–70	30,0
Eosinófilos (%)	1–6	1,0
Basófilos (%)	0–2	5,0
Linfócitos (%)	20–45	5,0
Monócitos (%)	2–12	5,0
Mieloblastos		4,0
Promielócitos		16,0
Mielócitos		5,0
Metamielócitos		6,0
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu L$ )	130–400	313
Plaquetócrito (%)	0,15–0,42	0,31
Vol. plaquetário médio (fL)	7,0–11,0	9,9
Índice disp. Plaquetário (fL)	25,0–65,0	65,6

Segundo os critérios da FAB, e dado que a maioria das células precursoras são promielócitos e apresentam intensa granulação primária, estamos diante de uma Leucemia Promielocítica, que é Crônica dado que a percentagem de blastos não ultrapassa os 20%.

Escolhi este caso por apresentar todos os precursores da série branca e por ser uma Leucemia Mielóide Crônica. Tem a particularidade de a granulação primária ser muito visível.



## 14º caso clínico

Neste caso, uma mulher de 62 anos ANM, temos uma redução não muito acentuada na série vermelha e temos a série megacariocítica preservada e ligeiramente aumentada.

A característica principal é a marcada leucocitose e neutrofilia, e a presença de todos os precursores mielóides no sangue periférico. Trata-se duma leucemia mielóide crónica (dado que temos 13% de mieloblastos em circulação no sangue periférico) que pode estar em fase de agudização.

Tabela 3.15 – Caso A.M.N.

	Val. Referência	Resultado
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	4.0-5.2	3,40
Hemoglobina (g/dL)	12-16	9,6
Hematócrito (%)	36-46	32,6
VGM (fL)	76-98	95,9
HGM (pg)	26-34	28,2
CHGM (g/dL)	31-37	29,4
Índice disp. Eritrocitário	11.5-15.0	19,6
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3.8-11.0	205,8
Neut. banda /Heterófilos	0-4	0
Neut. segmt. (%)	35-70	20
Eosinófilos (%)	1-6	1
Basófilos (%)	0-2	4
Linfócitos (%)	20-45	3
Monócitos (%)	2-12	2
Mieloblastos		13
Promielócitos		8
Mielócitos		29
Metamielócitos		5
Eritroblastos em %		7
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu L$ )	130-400	660
Plaquetócrito (%)	0.15-0.42	0,79
Vol. plaquetário médio (fL)	7.0-11.0	4,9
Índice disp. Plaquetário (fL)	25.0-65.0	44,6

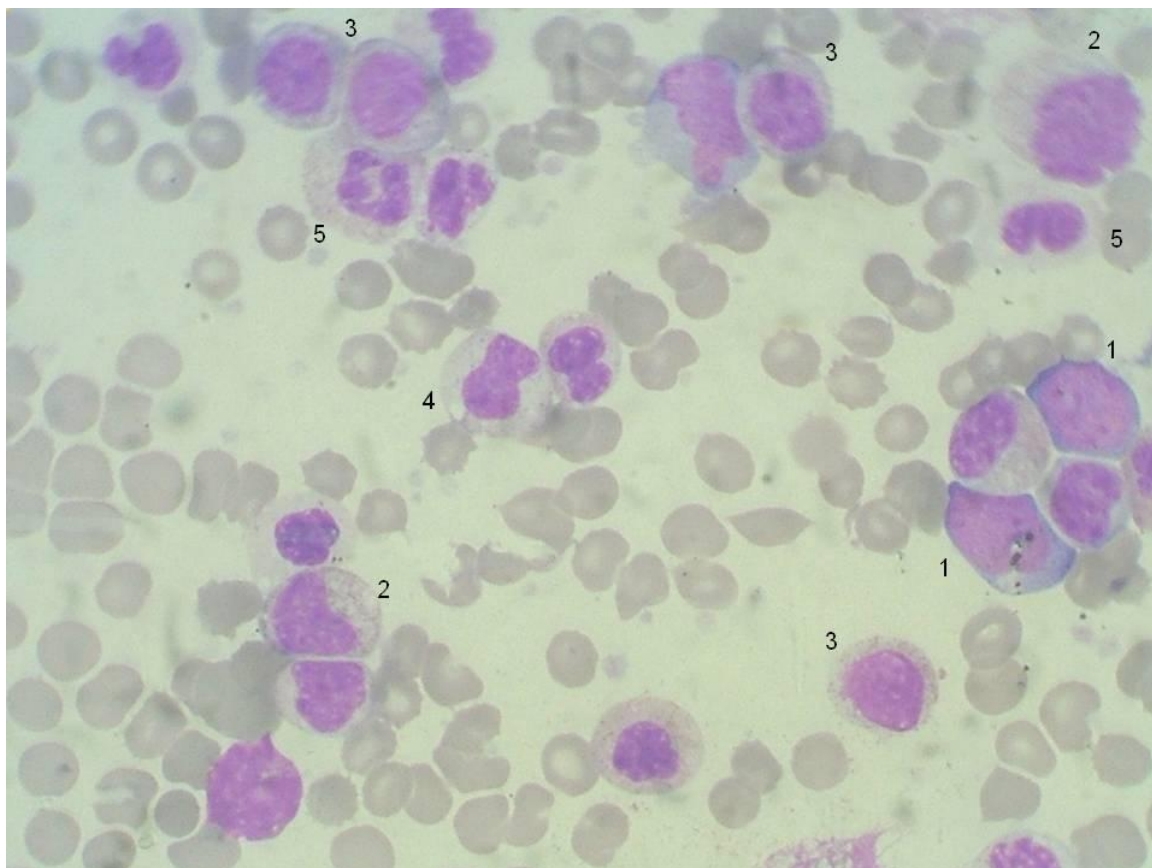


Figura 3.30 – Observa-se um campo característico desta lâmina com muitos precursores mielóides. Identifiquei algumas das células da seguinte forma:

- 1 – Mieloblastos, com relação Núcleo/Citoplasma elevada, cromatina laxa, alguns deles apresentam nucléolos quando se foca e desfoca com o parafuso micrométrico (embora este detalhe não seja patente na imagem).
- 2 – Promielócitos, células de dimensões maiores com menor relação Núcleo /Citoplasma. As granulações azurófilas (avermelhadas) no citoplasma estão presentes mas pouco evidentes.
- 3 – Mielócitos, células com cromatina mais densa e menor relação Núcleo /Citoplasma
- 4 – Metamielócitos, células com cromatina mais densa e menor relação Núcleo /Citoplasma que os mielócitos. O Núcleo é riniforme e apresenta o primeiro indício de segmentação.
- 5 – Neutrófilo segmentado.

Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

A leucocitose tão elevada desta amostra é evidente até pelo facto de em apenas um campo com uma ampliação de 1000x ser possível encontrar todos estes elementos figurados, enquanto na maior parte dos outros casos deste estudo tenho que recorrer a vários campos em locais diferentes do esfregaço.

Embora não seja o achado mais importante da lâmina, são também de notar as alterações à série vermelha, com ligeira anisocromia e poiquilocitose.

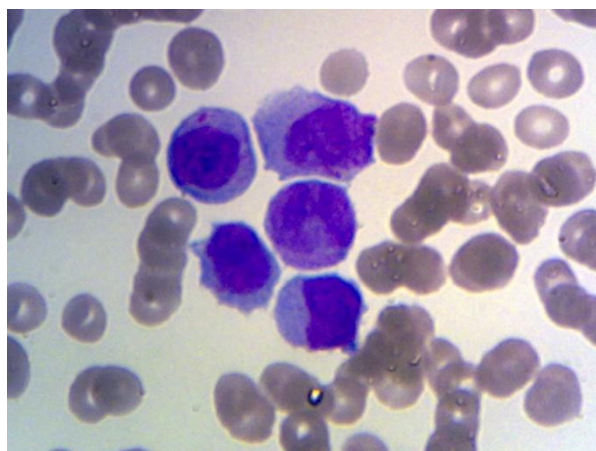
Escolhi este caso por ter grande interesse como instrumento de estudo e aprendizagem. Tive a possibilidade de repetir várias vezes as minhas contagens e obtive sempre valores próximos dos obtidos pelos colegas do Laboratório.

Uma divergência que notei é que nesta lâmina eu teria diferenciado o resultado em metamielócitos, neutrófilos em banda e neutrófilos segmentados, enquanto o Laboratório omitiu os neutrófilos em banda redistribuindo as células pelas outras duas classes. São detalhes que no caso presente não têm qualquer reflexo no diagnóstico.

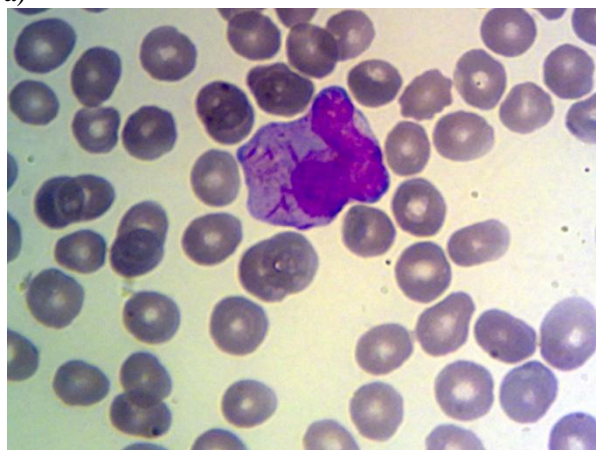
## 15º caso clínico

Neste caso, um jovem de 21 anos H.L.N., não há alterações significativas na série vermelha. Observa-se uma redução da contagem, hemoglobina e hematócrito, que atendendo à idade podem ser suspeitas. O número total de leucócitos é normal, mas são surpreendentes quer a quantidade de mieloblastos e promielócitos em circulação (respetivamente 55% e 27%) quer a trombocitopénia.

Nas imagens de microscopia abaixo com ampliação de 1000x, podemos ver na primeira imagem.



a)



b)

Tabela 3.16 – Caso H.L.N.

	Val. Referência	Resultado
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	4,5–5,9	3,92
Hemoglobina (g/dL)	13–17	12,0
Hematócrito (%)	41–53	33,6
VGM (fL)	76–98	85,7
HGM (pg)	26–34	30,6
CHGM (g/dL)	31–37	35,7
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	15,6
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3,8–11,0	11,9
Neut. banda/Heterófilos	0–4	3,0
Neut. segmt. (%)	35–70	3,0
Eosinófilos (%)	1–6	0,0
Basófilos (%)	0–2	0,0
Linfócitos (%)	20–45	14,0
Monócitos (%)	2–12	1,0
Mieloblastos		55
Promielócitos		27
Mielócitos		0,0
Metamielócitos		0,0
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu L$ )	130–400	14
Plaquetócrito (%)	0,15–0,42	0,01
Vol. plaquetário médio (fL)	7,0–11,0	8,3
Índice disp. Plaquetário (fL)	25,0–65,0	20,3

Figura 3.31 – a) vários mieloblastos e um promielócito (de maiores dimensões); b) mieloblasto com os caraterísticos feixes de Auer no citoplasma

Neste caso, como em outros, foi solicitado ao utente que levantasse os resultados com prontidão e foi contactado o médico assistente. O doente não referiu outras queixas senão pequenos episódios hemorrágicos e hematomas que o levaram à consulta.

## 16º caso clínico

Neste caso, uma mulher de 84 anos C.N.D., temos uma Leucocitose acentuada com  $84,2 \times 10^6$  leucócitos/L. A observação do esfregaço revelou a presença de grande quantidade de tricoleucócitos, também chamados *hairy cells*. Os tricoleucócitos são linfócitos B anormais com uma morfologia característica, com núcleo arredondado e citoplasma que parece espalhado com contornos pouco definidos.

Trata-se de uma leucemia a tricoleucócitos “clássica”. É uma forma não muito agressiva de leucemia linfocítica crônica, que nem sempre requer tratamento. A leucemia a tricoleucócitos variante, diferencia-se morfologicamente desta pelos contornos espiculados do citoplasma. Este caso não apresenta citopénias nas outras linhagens: Eritrócitos  $4,29 \times 10^{12}$ /L e Plaquetas  $170 \times 10^3/\mu\text{L}$ .

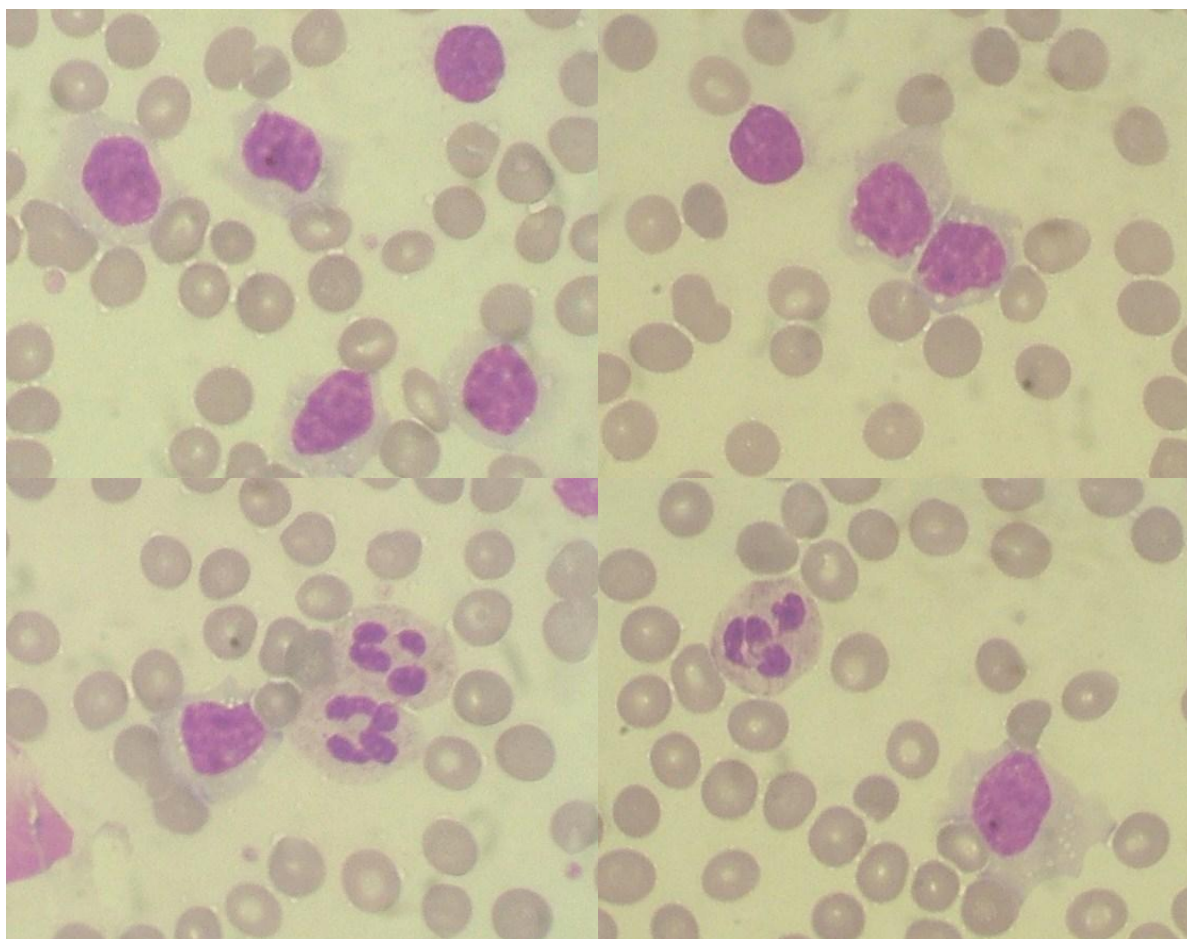


Figura 3.32 - No seu conjunto, nas 4 imagens acima identificam-se claramente 8 tricoleucócitos e 3 neutrófilos segmentados. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Escolhi este caso porque embora seja raro, e geralmente pouco agressivo, tem de ser reportado no resultado entre outros motivos para fazer o diagnóstico diferencial com outras leucemias de pior prognóstico.



## Patologia da linhagem linfóide

### 17º caso clínico

Trata-se de uma mulher de 83 anos, A.J.P., que apresenta ligeira anemia e leucocitose. A observação do esfregaço mesmo com baixa ampliação revela de imediato um grande predomínio de linfócitos (um campo a 400x tem em média 25 linfócitos e 2 neutrófilos) como é o caso da imagem abaixo, e alerta para a necessidade de observação mais atenta.

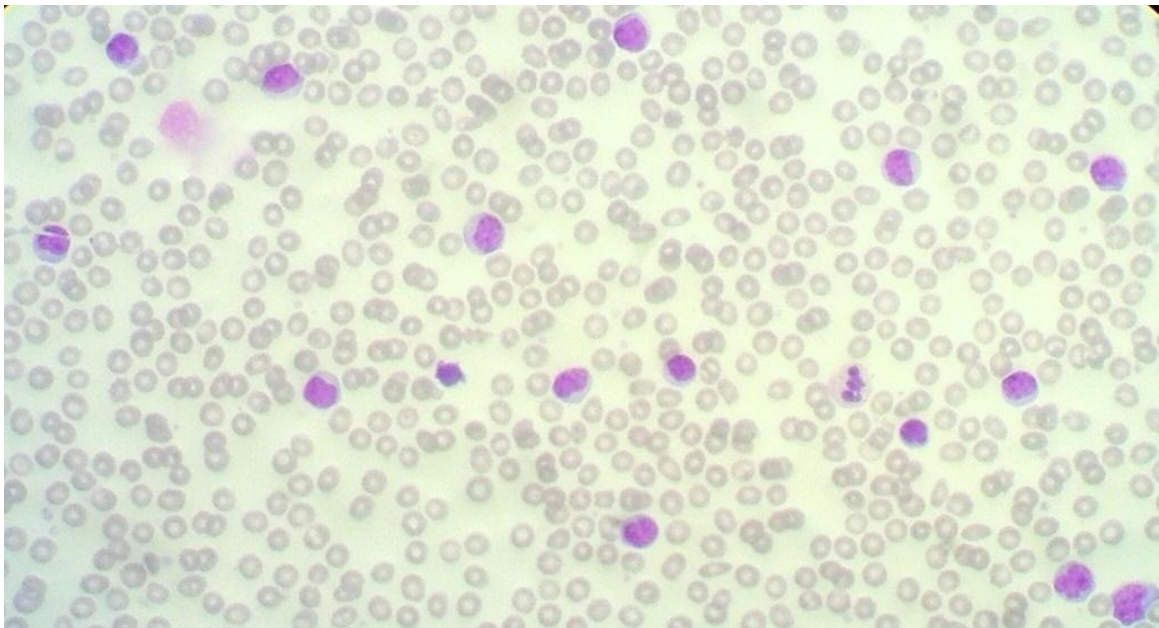
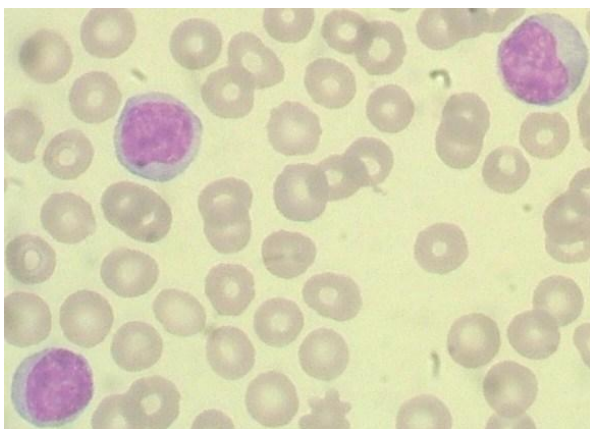


Figura 3.33 – Linfocitose evidente no voo da lâmina. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 400X.



A linfocitose é constituída na sua maioria por elementos maduros, mas ligeiramente maiores que os normais (repare-se na diferença de tamanho com os eritrócitos, que têm tamanho normal (VGM=82,6fL).

Figura 3.34 – Detalhe de alguns linfócitos presentes neste caso, são de grandes dimensões e alguns têm núcleos indentados. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Tabela 3.17 – Caso A.J.P.

	Val. Referência	Resultado
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	4,0–5,2	3,68
Hemoglobina (g/dL)	12–16	10,3
Hematócrito (%)	36–46	30,4
VGM (fL)	76–98	82,6
HGM (pg)	26–34	28,0
CHGM (g/dL)	31–37	33,9
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	14,9
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3,8–11,0	63,4
Neut. banda /Heterófilos	0–4	
Neut. segmt. (%)	35–70	7,0
Eosinófilos (%)	1–6	1,0
Basófilos (%)	0–2	0,0
Linfócitos (%)	20–45	86,0
Monócitos (%)	2–12	1,0
Prolinfócitos		5,0
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu L$ )	130–400	214
Plaquetócrito (%)	0,15–0,42	0,22
Vol. plaquetário médio (fL)	7,0–11,0	10,4
Índice disp. Plaquetário (fL)	25,0–65,0	47,8

Vários linfócitos têm citoplasma mais abundante que o normal e alguns deles têm regiões mais claras do núcleo que fazem lembrar os nucléolos dos prolinfócitos. Alguns dos linfócitos apresentam também núcleo indentado.

Observei 5% de pró-linfócitos, o que coincide com o resultado dado pelo Laboratório.

Observam-se também alguns linfócitos reativos, como os que são visíveis na imagem em baixo à direita (são 8% do total de leucócitos), mas o Laboratório optou por não dar esta informação para não confundir o diagnóstico, que é compatível com Leucemia Linfocítica Crônica.

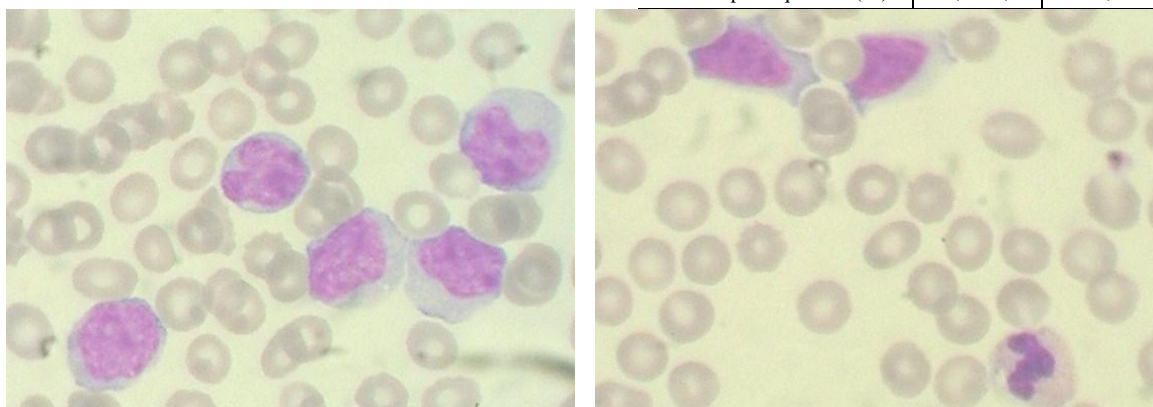


Figura 3.35 – a) Detalhe de alguns linfócitos presentes neste caso, b) dois linfócitos reativos e um neutrófilo. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X

Incluí este caso por se tratar de uma linfocitose acentuada com alguns prolinfócitos e alguns linfócitos reativos, mas sem sombras nucleares de Gumprech

18º caso clínico

Trata-se de uma mulher de 85 anos, M.R.M., sem patologia da série vermelha, com uma leucocitose moderada e linfocitose acentuada com presença de linfócitos atípicos e sombras nucleares de Gumprecht.

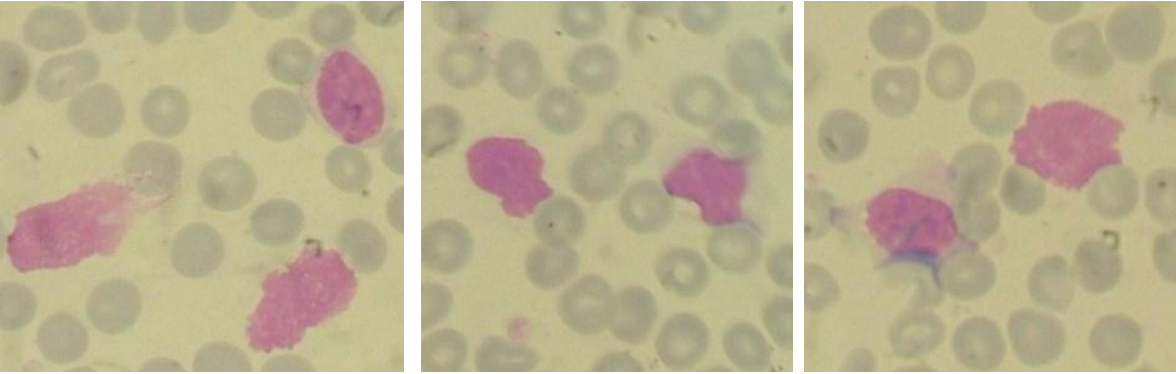


Figura 3.36 – Observam-se no total quatro sombras nucleares de Gumprecht, sem citoplasma visível e três linfócitos reativos. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X

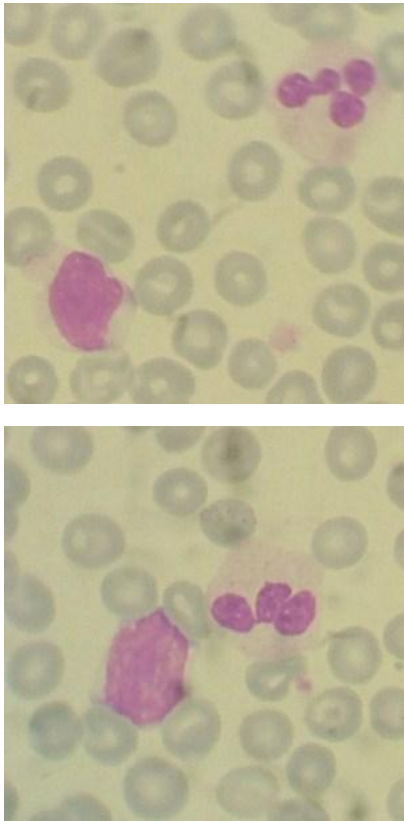


Tabela3.18 – Caso M.R.M.

	Val. Referência	Resultado
Eritrócitos (x10 <sup>12</sup> /L)	4,0–5,2	4,48
Hemoglobina (g/dL)	12–16	13,9
Hematócrito (%)	36–46	41,0
VGM (fL)	76–98	91,5
HGM (pg)	26–34	31,0
CHGM (g/dL)	31–37	33,9
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	12,2
WBC (x10 <sup>9</sup> /L)	3,8–11,0	37,8
Neut. banda /Heterófilos	0–4	
Neut. segmt. (%)	35–70	13,0
Eosinófilos (%)	1–6	1,0
Basófilos (%)	0–2	0,0
Linfócitos (%)	20–45	64,0
Monócitos (%)	2–12	2,0
Linfócitos atípicos		30,0
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	130–400	167
Plaquetócrito (%)	0,15–0,42	0,21
Vol. plaq. médio (fL)	7,0–11,0	12,7
Índice disp. Plaquetária (fL)	25,0–65,0	73,7

Figura 3.37 – Observam-se um neutrófilo e um linfócito reativo em cada uma das imagens. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.



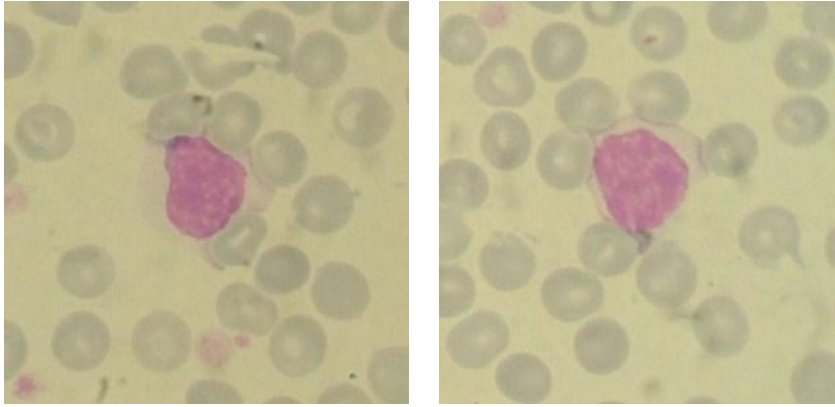


Figura 3.38 – Observe um linfócito reativo em cada uma das imagens. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Este caso apresenta também algumas plaquetas de grandes dimensões e o índice de dispersão plaquetária mais alto da minha amostragem.

Escolhi este caso por se tratar de uma leucemia linfocítica crónica e por serem muito visíveis os linfócitos atípicos e sombras nucleares de Gumprecht

Patologia viral

19º caso clínico

B.R.D. é do sexo masculino e tem 18 anos. Tem-se sentido muito cansado, com febre alta e dores de garganta. O médico enviou-o ao laboratório onde fez um hemograma.

A série vermelha não apresentava nenhuma anomalia, mas o aparelho de hematologia deu sinal de *large unstained cells* ou células não coradas pela mieloperoxidase de grandes dimensões, que geralmente são linfócitos grandes. Esta informação alerta para a possibilidade de existirem na lâmina linfócitos imaturos, linfócitos activados ou outros agranulócitos grandes.

Na observação do esfregaço foi de imediato visível a presença de grande número de linfócitos activados, de tal forma que é possível percorrer vários campos a 1000x e encontrar vários linfócitos sem ver um único neutrófilo.

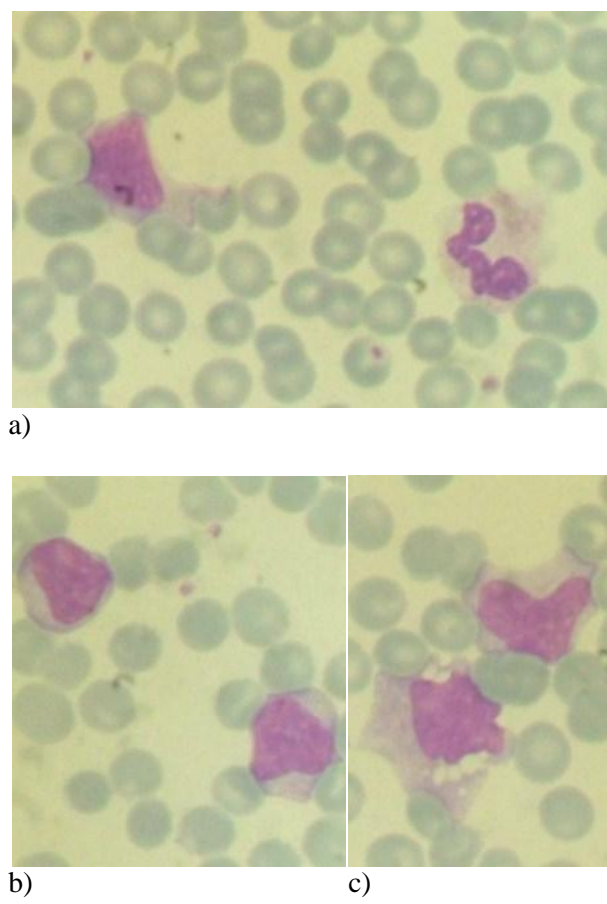


Tabela 3.19 – Caso B.R.D.

	Val. Referência	Resultado
Eritrócitos (x10 <sup>12</sup> /L)	4,5–5,9	4,82
Hemoglobina (g/dL)	13–17	13,1
Hematócrito (%)	41–53	40,5
VGM (fL)	76–98	84,0
HGM (pg)	26–34	27,2
CHGM (g/dL)	31–37	32,3
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	12,9
WBC (x10 <sup>9</sup> /L)	3,8–11,0	8,4
Neut. banda /Heterófilos		9,0
Neut. segmt. (%)	35–70	12,0
Eosinófilos (%)	1–6	1,0
Basófilos (%)	0–2	0,0
Linfócitos (%)	20–45	54,0
Monócitos (%)	2–12	3,0
LUCS (large unst. cells)		13,9
Linfócitos atípicos		21,0
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	130–400	188
Plaquetócrito (%)	0,15–0,42	0,18
Vol. plaquetário médio (fL)	7,0–11,0	9,5
Índice disp. Plaquetário (fL)	25,0–65,0	60,9

Figura 3.39 – a) São visíveis um linfócito ativado e um neutrófilo. b) e c) linfócitos ativados. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

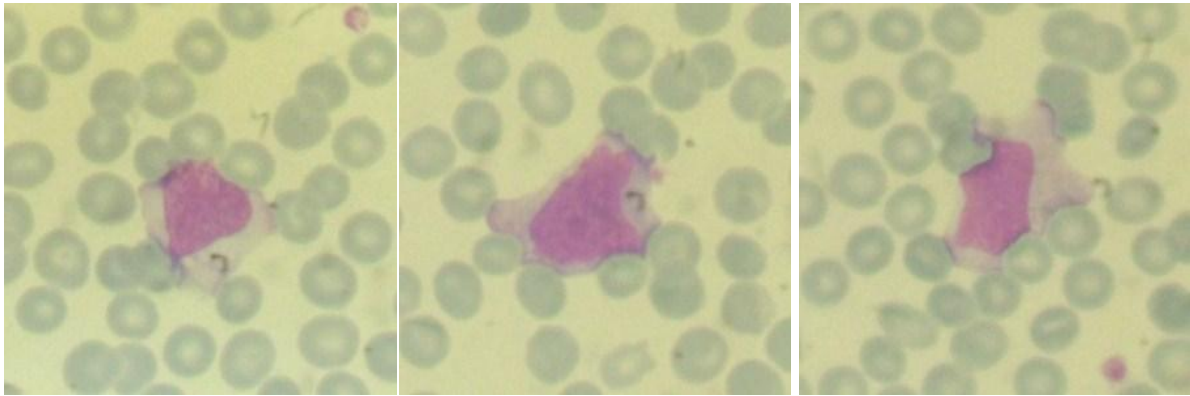


Figura 3.40 – Outros exemplos de linfócitos ativados. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Pelos sintomas apresentados e pelo aspecto do esfregaço, BRD pode estar num episódio de mononucleose infecciosa, e o diagnóstico pode ser confirmado se tiver um resultado positivo para VCA IgM.

## 20º caso clínico

E.T.V. é seropositivo para HIV e HCV. Tem 45 anos e é do sexo masculino. Apresenta linfopenia relativa e absoluta<sup>1</sup> como é normal no doente de SIDA e neutrofilia relativa com considerável desvio à esquerda e 62% de bastonetes. Os neutrófilos apresentam uma granulação citoplasmática suspeita de granulações tóxicas. A neutrofilia em conjunto com o desvio à esquerda e as granulações apontam para uma possível infecção bacteriana, quadro frequente no doente de SIDA. Observa-se igualmente uma trombocitopenia significativa. É muito provável que se trate de trombocitopenia associada ao HIV, uma entidade descrita na literatura.

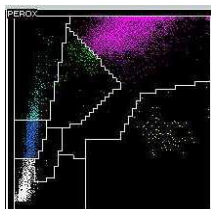


Figura 3.41 – Citograma de complexidade por atividade peroxidase. Note-se a nuvem de pontos na região dos granulócitos de grandes dimensões o que indica a presença de células grandes com atividade peroxidase positiva (metamielócitos e bastonetes).

Tabela 3.20 – Caso E.T.V.

	Val. Referência	Resultado	
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	4,5–5,9	4,56	
Hemoglobina (g/dL)	13–17	13,2	
Hematócrito (%)	41–53	40,8	
VGM (fL)	76–98	89,5	
HGM (pg)	26–34	28,9	
CHGM (g/dL)	31–37	32,4	
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	15,1	
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3,8–11,0	6,3	
Neut. banda /Heterófilos		62,0	<i>3906</i>
Neut. segmt. (%)	35–70	23,0	<i>1449</i>
Eosinófilos (%)	1–6	0,0	<i>0</i>
Basófilos (%)	0–2	0,0	<i>0</i>
Linfócitos (%)	20–45	5,0	<i>315</i>
Monócitos (%)	2–12	2,0	<i>126</i>
Metamielócitos		8,0	
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu L$ )	130–400	32	
Plaquetócrito (%)	0,15–0,42	0,04	
Vol. plaquetário médio (fL)	7,0–11,0	13,8	
Índice disp. Plaquetário (fL)	25,0–65,0	71,2	

As alterações hematológicas que se encontram no doente com SIDA são muito variadas, geralmente de difícil interpretação porque resultam por um lado da doença e por outro dos fármacos anti-retrovirais. Dependem certamente da história clínica e do tratamento em curso.

<sup>1</sup> Valores absolutos em itálico  $\times 10^6/L$ . O valor de referência para os linfócitos é o intervalo [800, 4500]  $\times 10^6/L$

Neste caso as alterações, como se pode observar na Figura 3.42 resumem-se a granações tóxicas e desvio à esquerda.

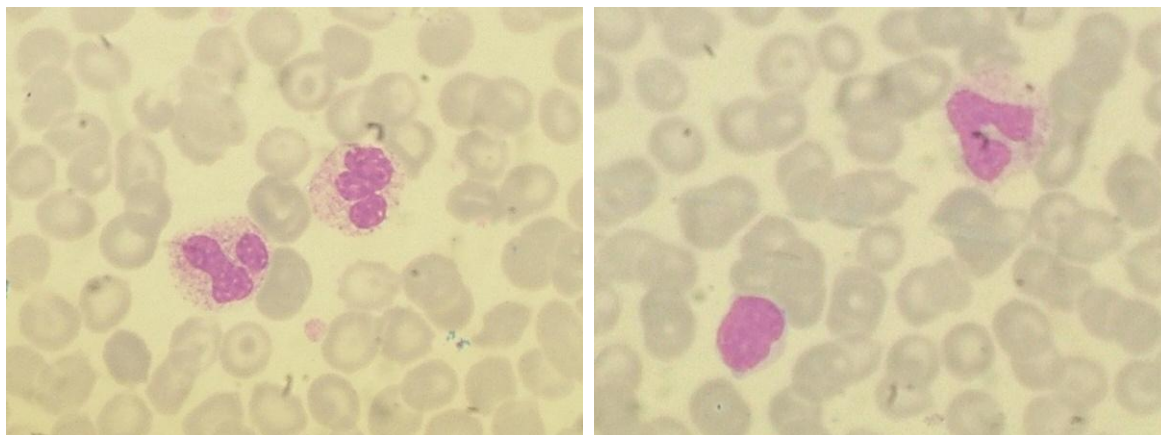


Figura 3.42 – a) granações tóxicas e desvio à esquerda ; b) linfócito e outra célula com um núcleo em ferradura se pode tratar de um monócito. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Incluí este caso por se tratar de um doente positivo para HIV e HCV e por se observarem granações tóxicas e desvio à esquerda possivelmente de origem infecciosa.

## Particularidades:

### 21º caso clínico

Neste caso de uma mulher de 31 anos, P.L.I., o aparelho de contagens deu um alarme de agregados plaquetários e não apresentou resultados para os parâmetros relacionados com as plaquetas.

No esfregaço nativo feito no ato da colheita é normal encontrar alguns agregados plaquetários. No esfregaço feito a partir da amostra com EDTA, como é o presente caso, o normal é não haver agregados. Se houver, o mais provável é a presença de anticorpos anti-EDTA.

Foi necessário repetir a colheita com outro agente anti-coagulante (citrato ou heparinato de lítio) para confirmar as contagens de eritrócitos e leucócitos e obter contagens de plaquetas.

A maioria dos sistemas automatizados alerta o utilizador para a existência de agregados plaquetários, no entanto é sempre necessário estar atentos porque a presença de agregados plaquetários pode ser a causa uma trombocitopenia ou até de uma pancitopenia artefactuais.

Neste caso os resultados das linhagens mielóide e eritróide não pareciam alterados, e também não foi possível comparar os resultados da colheita em EDTA com a segunda colheita com outro agente anti-coagulante.

Tabela 3.21 – Caso P.L.I.

	Val. Referência	Resultado
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	4,0–5,2	4,71
Hemoglobina (g/dL)	12–16	13,8
Hematócrito (%)	36–46	39,5
VGM (fL)	76–98	83,9
HGM (pg)	26–34	29,3
CHGM (g/dL)	31–37	34,9
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	12,4
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3,8–11,0	5,3
Neut. segmt. (%)	35–70	52,1
Eosinófilos (%)	1–6	2,3
Basófilos (%)	0–2	0,6
Linfócitos (%)	20–45	37,1
Monócitos (%)	2–12	7,9
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu L$ )	130–400	-
Plaquetócrito (%)	0,15–0,42	-
Vol. plaquetário médio (fL)	7,0–11,0	-
Índice disp. Plaquetário (fL)	25,0–65,0	-

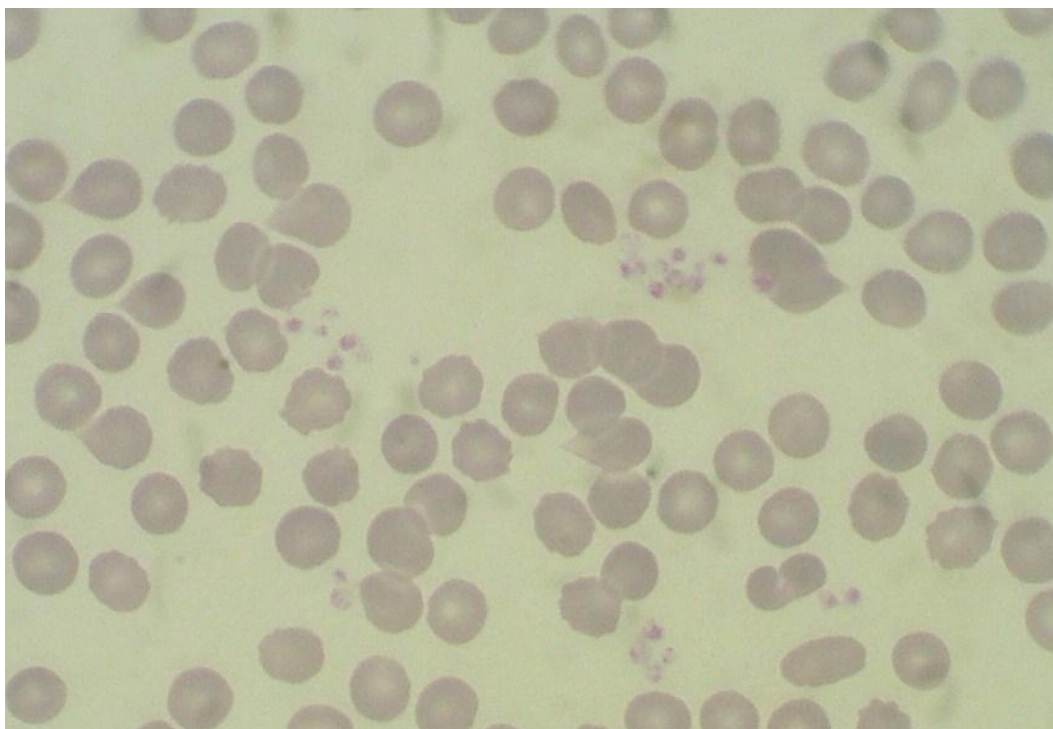


Figura 3.43 – Esfregaço com agregados plaquetários. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Incluí este caso no relatório por ser uma causa a excluir na trombocitopénia sem causa aparente.

No Laboratório de Hematologia é frequente recebermos amostras de origem veterinária. O técnico tem de estar preparado para as saber interpretar e o Laboratório deve dispor dos valores de referência para cada espécie. Durante o meu estágio pude contactar com algumas destas amostras e reportam-se aqui duas delas.

## 22º caso clínico

Trata-se de uma cadela de 10 anos J.M.A., a amostra foi colhida em 15-03-2010. Não temos informação clínica, mas apenas um resultado anterior no sistema informático.

O primeiro elemento de relevo ao observar o esfregaço é o facto de os eritrócitos serem de pequenas dimensões e parecerem mais ricos em hemoglobina quando comparados com o correspondente humano.

De facto os valores de referência da série vermelha para o canídeo são consideravelmente mais altos, sobretudo no hematócrito, hemoglobina total e contagem de eritrócitos, enquanto o valor de referência do volume globular médio é menor no canídeo que no humano.

Tabela 3.22 – Caso J.M.A.

Mas os valores da série vermelha estão todos eles dentro da normalidade para o canídeo, excetuando um valor ligeiramente diminuído da concentração de hemoglobina globular média, que no contexto dos restantes resultados não parece significativo.

	Val. Referência Canídeo (F)	Val. Referência Humano (F)	Resultado 15-03-2010	Resultado 24-11-2009
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	6,20–8,70	4,0–5,2	7,19	6,55
Hemoglobina (g/dL)	14,1–20,0	12–16	15,8	14,5
Hematócrito (%)	43,0–59,0	36–46	50,0	42,9
VGM (fL)	60,0–75,0	76–98	69,5	65,5
HGM (pg)	22,5–27,2	26–34	22,0	22,1
CHGM (g/dL)	33,6–38,3	31–37	31,6	33,8
Índice disp. Eritrocitário	11,9–16,0	11,5–15,0	11,3	11,4
WBC ( $\times 10^9/L$ )	6,4–15,9	3,8–11,0	12,8	9,6
Heterófilos (%)			39,0	13,0
Neut. segmt. (%)	43,0–88,0	35–70	35,0	55,0
Eosinófilos (%)	<17	1–6	3,0	9,0
Basófilos (%)	<0,4	0–2	0,0	0,0
Linfócitos (%)	2,8–36,4	20–45	7,0	17,0
Monócitos (%)	1,7–10,8	2–12	16,0	6,0

Outro achado desta amostra é uma ligeira monocitose, que sobretudo quando comparada com os valores obtidos quatro meses antes e que permite suspeitar que se esteja agora em presença de uma infeção bacteriana, ou de qualquer outra causa de stresse.



Nesta lâmina é interessante poder procurar heterófilos que são granulócitos maduros correspondentes aos neutrófilos humanos, mas presentes nos mamíferos e em outros animais (aves e répteis). Em algumas espécies apresentam granulação citoplasmática de dimensões e coloração variáveis.

Embora durante a componente curricular do mestrado não tenha sido possível observar este tipo de amostras veterinárias, o seu interesse no laboratório de hematologia é grande e sempre que aparece uma amostra destas é necessário aproveitar a oportunidade para aprender um pouco mais.

Nas imagens abaixo, obtidas com ampliação de 1000x vemos da esquerda para a direita um neutrófilo, um possível heterófilo e um monócito. Observe-se a anisocitose plaquetária na imagem da esquerda.

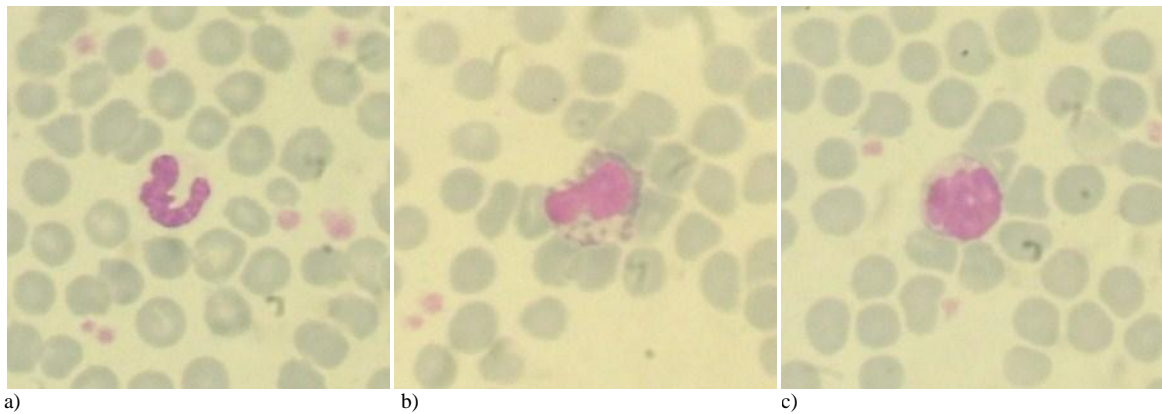


Figura 3.44 – a) um neutrófilo, b) um possível heterófilo c) monócito. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Escolhi este caso por se tratar um caso de veterinária

### 23º caso clínico

Caso previamente analisado no laboratório e de que dispomos apenas uma lâmina. Trata-se de um canídeo do qual não sabemos qualquer dado, a não ser que era portador de um parasita sanguíneo *Hepatozoon canis*.

O gamonte, que se observa à direita é a forma intraleucocitária que infecta os leucócitos em circulação. O seu aspeto é suficientemente caraterístico para ser fácil a sua identificação.

Reporto aqui este caso dado que a sua observação nos esfregaços sanguíneos é a principal ferramenta no diagnóstico. Estão também disponíveis técnicas moleculares com grande especificidade e sensibilidade, mas em que o custo é maior.

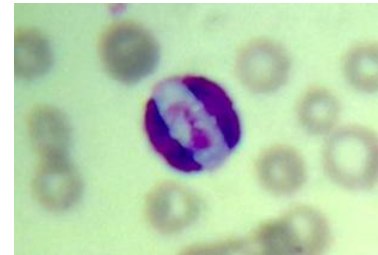


Figura 3.45 – Gamonte intra-leucocitário de *Hepatozoon canis*. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

## 24º caso clínico

Quero concluir esta sequência de casos clínicos com um caso que não apresenta qualquer patologia do foro hematológico. É muito útil antes de ver os casos patológicos, e se necessário durante o dia de trabalho entre duas lâminas de doentes, observar uma lâmina que não apresente qualquer patologia para ter um termo de comparação, quer nas dimensões, quer na coloração dos vários elementos figurados, granulações e outras estruturas celulares.

A.M.L. é uma mulher de 29 anos e os seus resultados são apresentados abaixo.

Vemos também abaixo imagens de dois neutrófilos característicos desta lâmina.

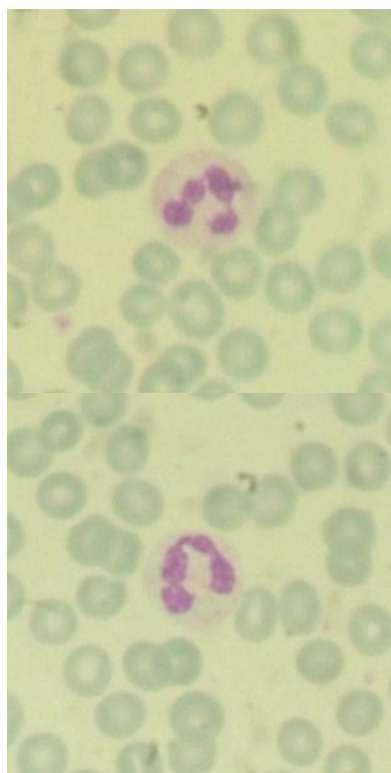


Tabela 3.23 – Caso A.M.L.

	Val. Referência	Resultado
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	4,0–5,2	4,80
Hemoglobina (g/dL)	12–16	13,6
Hematócrito (%)	36–46	39,8
VGM (fL)	76–98	82,9
HGM (pg)	26–34	28,3
CHGM (g/dL)	31–37	34,2
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	12,1
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3,8–11,0	13,7
Neut. segmt. (%)	35–70	84,3
Eosinófilos (%)	1–6	2,4
Basófilos (%)	0–2	0,3
Linfócitos (%)	20–45	8,9
Monócitos (%)	2–12	4,1
Linfócitos atípicos		0,8
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu L$ )	130–400	357
Plaquetócrito (%)	0,15–0,42	0,25
Vol. plaquetário médio (fL)	7,0–11,0	7,1
Índice disp. Plaquetário (fL)	25,0–65,0	43,0

Figura 3.46 – Dois neutrófilos. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

Nas imagens abaixo são visíveis da esquerda para a direita dois linfócitos, um de médias dimensões e um pequeno linfócito. Na imagem da direita observam-se um.

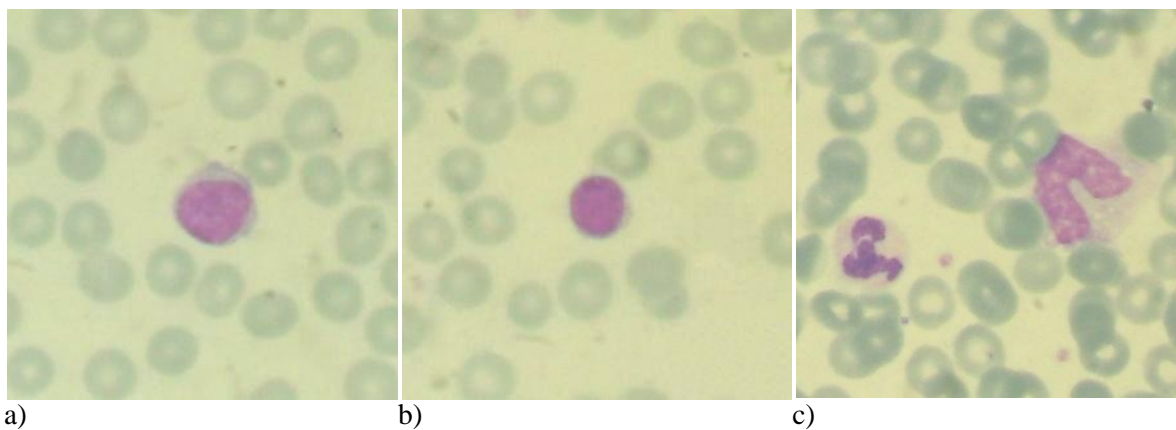


Figura 3.47 – a) linfócito de médias dimensões; b) pequeno linfócito; c) neutrófilo e basófilo. Coloração de May-Grünwald Giemsa. Ampliação de 1000X.

## Considerações finais

Alguns dos esfregaços utilizados neste relatório, foram estendidos e corados por mim. Durante o estágio pude conforme a necessidade, executar esfregaços no ato de colheita, ou no laboratório de Hematologia quando foi necessário executar mais lâminas de casos interessantes.

No Laboratório Dr. Joaquim Chaves os esfregaços e as colorações são executados pelo sistema automatizado da Siemens.

Ambos os sistemas têm vantagens e inconvenientes. As boas práticas indicam que o esfregaço deve ser feito logo no ato da colheita para que a amostra espere o mínimo de tempo possível e evitar que ocorram alterações e apareçam artefactos que não são representativos da morfologia e estrutura dos elementos figurados no seu meio.

Por outro lado o realizar um esfregaço no ato de colheita, quando muitos dos exames são de rotina e a população alvo é na sua maioria saudável como é o caso do ambulatório, gera grandes quantidades de lâminas que nunca serão vistas (no Labomarques por exemplo de 150 amostras/dia eram vistas em média apenas 10 por dia). Quando se passa para um laboratório de maior escala com uma média de 1500 hemogramas/dia, a quantidade de lâminas a processar, referenciar, arquivar e pesquisar em caso de necessidade é incomportável e tem de ser encontradas outras soluções.

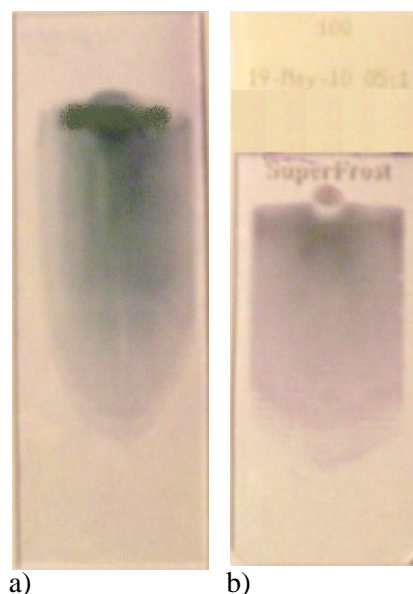


Figura 3.48 – a) Esfregaço feito e corado por mim (caso AML). O esfregaço é identificado a lápis na região da cabeça; b) Esfregaço feito e corado e identificado pelo sistema automatizado (caso HLN).

Assim neste último caso, as lâminas são feitas apenas nos casos em que o hematologista o requeira através do sistema informático. A amostra de sangue total em EDTA é chamada logo após ser processada pelos equipamentos analíticos e o hematologista ter detectado alguma alteração dos valores, algum quadro suspeito nos citogramas ou na lista de alarmes do equipamento. O esfregaço é feito pelo equipamento de forma automatizada assim como a coloração.

Uma das vantagens mais interessantes do sistema automático é o facto de todos os esfregaços serem muito idênticos entre si na quantidade de sangue dispensada, na velocidade com que é feito o estendimento, de forma que após algumas lâminas já sabemos todas as distâncias ao microscópio, sabemos onde está a região de leitura, onde se encontram os *rouleux*, a cauda do esfregaço e os bordos da lâmina. Como os esfregaços são todos muito iguais na quantidade de sangue dispensada e na sua distribuição, é muito fácil distinguir aquilo que é variável: as citopénias, as leucocitoses são muito fáceis de distinguir e de comparar.

Os esfregaços feitos manualmente têm muito maior variabilidade entre operadores e até quando executados pelo mesmo operador. É frequente encontrar esfregaços muito curtos, com zonas de leitura muito escassas, o que torna a visualização ao microscópio e as fórmulas manuais tarefas não fáceis. Outros esfregaços podem ser óptimos, com boas regiões de leitura que podem até ser melhores que os esfregaços feitos pelo equipamento.

Por outro lado fiquei com a impressão de que as colorações manuais permitem visualizar melhor as granulações citoplasmáticas (primárias e secundárias). Se compararmos o caso 15 com os casos 14 e 16 podemos ter um exemplo, embora não seja o suficiente para fazer uma regra. Mas pode ser que seja apenas uma questão de corantes. Certamente que o equipamento poderá ser mais reprodutível que o operador, porque os tempos de incubação em cada corante e lavagem são muito mais precisos, portanto trata-se de otimizar os protocolos e mudar os corantes e soluções de lavagem nos tempos oportunos.

## **Bibliografia**

- Color Atlas Of Hematology - Practical And Clinical Diagnosis, Thieme 2004
- Modern Hematology biology and clinical management 2<sup>nd</sup> Ed Humana Press 2007
- Miguez-Burbano MJ, Jackson J Jr, Hadrigan S. Thrombocytopenia in HIV disease: clinical relevance, physiopathology and management. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2005 Oct;3(4):365-76.
- Loffler H, Rastetter J, Haferlach. Atlas of Clinical Hematology, 6th Ed. Springer, 2004
- Greer JP *et al.* Wintrobe's Clinical Hematology 11<sup>th</sup> Ed, Lippincott 2003

Apêndice I  
Tabela 3.24 – Caso ADD

	Data Val. Referência	03-07-2009	17-11-2009	23-03-2010	01-06-2010	18-10-2010	17-01-2011	01-04-2011
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	4,5–5,9	4,65	4,50	4,50	3,99	4,24	4,11	3,71
Hemoglobina (g/dL)	13–17	10,6	10,3	10,3	10,1	9,3	8,7	8,3
Hematócrito (%)	41–53	33,9	33,0	33,4	32,1	29,3	27,9	27,1
VGM (fL)	76–98	72,9	73,3	74,2	80,5	69,1	67,9	73,0
HGM (pg)	26–34	22,8	22,9	22,9	25,3	21,9	21,2	22,4
CHGM (g/dL)	31–37	31,3	31,2	30,8	31,5	31,7	31,2	30,6
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	17,0	17,2	23,5	16,5	18,3	18,8	21,6
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3,8–11,0	3,6	5,3	5,8	4,8	4,2	4,7	6,8
Neut. Segmt (%)	35–70	50,7	55,5	66,2	57,9	63,2	66,8	75,6
Eosinófilos (%)	1–6	6,3	4,6	9,5	4,7	2,4	1,9	1,1
Basófilos (%)	0–2	0,4	0,5	0,1	0,4	0,6	0,3	0,3
Linfócitos (%)	20–45	33,4	30,1	17,2	26,8	25,0	21,3	14,5
Monócitos (%)	2–12	9,1	9,3	7,0	10,1	8,7	9,8	8,5
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu L$ )	130–400	195	179	296	218	194	160	285
Plaquetócrito (%)	0,15–0,42	0,21	0,22	0,27	0,23	0,18	0,17	0,31
Vol. plaquetário médio (fL)	7,0–11,0	10,8	12,0	9,2	10,6	9,2	10,4	10,8
Índice de dispersão Plaquetário (fL)	25,0–65,0	62,7	62,0	59,4	66,9	59,7	64,4	66,4
Ferritina ( $\mu g/L$ )	20–250		19	84	20,1	5	20,2	37,4
Ferro Sérico ( $\mu g/dL$ )	70–180		32	41	28		25	22
Cap tot fix Fe (mg/dL)	220–400		556	378	571		599	477
Transferrina (mg/dL)	200–360		389	264	399		419	333
Reticulócitos %	0,2–2,1		2,06	1,59	1,80			1,90
Dep creatinina (mL/min)	$\geq 60$	47						
Ureia (mg/dL)	<43		134	128	205	207	253	187
Sódio (mmol/L)	136–146	136	136	131	131	125		118
Potássio (mmol/L)	3,5–5,1	3,9	4,7	5,1	4,2	4,8		5,7
Cloreto (mmol/L)	101–109	96	99	94	92	86		86



## Apêndice II

Tabela 3.25 – Caso MLP (continua)

	<div> <div>Data</div> <div>Val. Referên.</div> </div>	21-01-2009	17-02-2009	12-03-2009	20-04-2009	15-06-2009	17-07-2009	24-08-2009	20-10-2009	18-11-2009	15-12-2009	07-01-2010	22-02-2010	22-03-2010	09-04-2010
Eritrócitos (x10 <sup>12</sup> /L)	4,0–5,2	4,50	4,44	4,34	4,17	3,95	3,65	3,25	3,18	2,90	2,86	2,85	2,90	2,69	2,69
Hemoglobina (g/dL)	12–16	13,1	13,1	13,3	13,1	13,3	13,0	11,9	12,5	12,0	11,9	12,1	11,8	10,9	11,0
Hematócrito (%)	36–46	40,8	40,8	41,0	40,0	40,4	39,3	35,5	36,7	35,5	35,5	35,3	35,7	33,3	33,4
VGM (fL)	76–98	90,7	91,9	94,5	95,9	102,3	107,7	109,2	115,4	122,4	124,1	123,9	123,1	123,8	124,2
HGM (pg)	26–34	29,1	29,5	30,6	31,4	33,7	35,6	36,6	39,3	41,4	41,6	42,5	40,7	40,5	40,9
CHGM (g/dL)	31–37	32,1	32,1	32,4	32,8	32,9	33,1	33,5	34,1	33,8	33,5	34,3	33,1	32,7	32,9
Índice disp. Eritrocitário	11,5–15,0	17,6	19,1	18,7	17,8	18,3	20,2	19,8	15,9	15,4	15,6	15,9	15,5	15,9	15,8
WBC (x10 <sup>9</sup> /L)	3,8–11,0	8,9	7,5	6,8	6,3	5,5	5,4	7,5	5,9	5,3	5,1	5,3	4,7	4,4	3,5
Neut. segmt (%)	35–70	71,5	67,6	68,0	70,7	68,0	71,9	76,8	71,7	71,4	66,7	71,7	68,7	67,9	80,8
Eosinófilos (%)	1–6	1,9	2,6	2,0	2,5	2,2	1,1	1,1	1,8	2,1	2,6	1,8	2,8	2,3	2,7
Basófilos (%)	0–2	1,0	1,2	0,8	0,6	0,7	0,8	0,2	0,7	0,6	0,6	0,3	0,6	0,3	0,5
Linfócitos (%)	20–45	20,4	23,8	25,0	21,6	25,2	22,9	18,4	22,2	21,8	26,5	22,8	23,8	26,2	12,3
Monócitos (%)	2–12	5,2	4,7	4,2	4,5	3,9	3,4	3,4	3,6	4,1	3,7	3,4	4,1	3,3	3,6
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	130–400	426	433	357	386	291	363	495	573	597	544	486	578	476	572
Plaquetócrito (%)	0,15–0,42	0,40	0,40	0,40	0,40	0,28	0,35	0,48	0,53	0,54	0,53	0,47	0,55	0,46	0,54
Vol. plaq. médio (fL)	7,0–11,0	9,3	9,3	9,7	10,0	9,5	9,6	9,8	9,3	9,1	9,7	9,8	9,5	9,6	9,5
Índice disp. Plaq. (fL)	25,0–65,0	60,3	63,6	60,8	62,6	60,8	63,7	62,1	55,2	60,2	60,4	53,7	55,6	56,5	56,9

Apêndice II (cont.)

Tabela 3.26 – Caso MLP (cont.)

	<div> <div>Data</div> <div>Val. Referên.</div> </div>	08-05-2010	15-06-2010	19-07-2010	30-07-2010	30-08-2010	04-10-2010	22-10-2010	14-01-2011	17-02-2011	11-03-2011	04-04-2011	20-04-2011	30-05-2011	16-06-2011
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	4,0-5,2	2,74	2,80	2,83	2,77	2,73	2,70	2,75	2,93	2,88	3,10	2,98	2,83	2,79	2,81
Hemoglobina (g/dL)	12-16	11,3	11,7	11,7	11,3	11,0	11,0	11,4	12,2	11,7	12,3	12,1	11,7	11,2	11,6
Hematócrito (%)	36-46	34,4	35,2	35,3	34,6	33,9	34,1	35,1	38,0	36,5	39,7	38,1	35,9	35,7	36,0
VGM (fL)	76-98	125,5	125,7	124,7	124,9	124,2	126,3	127,6	129,7	126,7	128,1	127,9	126,9	128,0	128,1
HGM (pg)	26-34	41,2	41,8	41,3	40,8	40,3	40,7	41,5	41,6	40,6	39,7	40,6	41,3	40,1	41,3
CHGM (g/dL)	31-37	32,8	33,2	33,1	32,7	32,4	32,3	32,5	32,1	32,1	31,0	31,8	32,6	31,4	32,2
Índice disp. Eritrocitário	11,5-15,0	16,0	15,1	15,0	14,7	15,2	15,6	15,9	15,7	16,2	16,9	16,9	16,8	16,4	16,4
WBC ( $\times 10^9/L$ )	3,8-11,0	4,8	4,4	4,6	4,1	4,7	3,7	4,0	4,3	4,5	5,3	5,2	4,9	4,4	4,8
Neut. Segmt (%)	35-70	69,7	68,4	69,4	65,9	68,2	76,8	71,0	71,3	71,2	76,1	76,0	75,7	70,4	71,5
Eosinófilos (%)	1-6	2,6	2,2	2,4	2,1	2,4	2,2	1,1	2,5	2,4	1,2	2,0	2,0	2,1	2,9
Basófilos (%)	0-2	0,2	0,4	0,4	0,6	0,5	0,4	0,5	0,5	0,8	0,7	0,0	0,7	0,5	0,4
Linfócitos (%)	20-45	23,9	26,2	25,5	27,8	25,5	16,7	24,3	22,6	22,0	19,2	19,0	18,3	22,3	22,1
Monócitos (%)	2-12	3,5	2,7	2,3	3,7	3,5	3,9	3,1	3,2	3,6	2,8	3,0	3,3	4,7	3,1
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu L$ )	130-400	558	498	528	556	540	532	478	652	606	513	546	486	685	442
Plaquetócrito (%)	0,15-0,42	0,52	0,48	0,51	0,55	0,54	0,51	0,45	0,64	0,61	0,57	0,56	0,49	0,67	0,42
Vol. plaq. médio (fL)	7,0-11,0	9,4	9,6	9,7	9,9	9,9	9,6	9,4	9,7	10,0	11,1	10,3	10,1	9,8	9,6
Índice disp. Plaq. (fL)	25,0-65,0	54,2	53,7	57,1	58,1	61,1	58,0	58,3	57,0	59,9	64,2	60,8	62,2	61,2	59,5

## **Agradecimentos**

Em cada uma das nossas realizações pessoais, além de um considerável esforço próprio, escondem-se normalmente grande número de ideias, sugestões, críticas, estímulos, esclarecimentos de dúvidas e outras colaborações de muitas pessoas.

Menciono aqui o nome de algumas dessas pessoas que tiveram uma colaboração mais direta, mas muitas outras há entre os meus amigos que foram e continuam a ser importantes e que por motivos de espaço não é possível mencionar aqui.

Ao dr. Paulo Antunes pelo acompanhamento na bancada de Hematologia do Labomarques, pelas muitas lâminas que me foi mostrando e pelos esclarecimentos das dúvidas.

À dra Inês Stilwell pelo trabalho conjunto no isolamento e identificação das estirpes, e pela disponibilidade na discussão dos resultados.

Ao dr. Carlos Marques pelo seu incentivo permanente e pela sua disponibilidade sempre que precisei de um conselho.

À todos os colegas do Labomarques, não só pelo período de estágio, mas por tudo o que pude aprender e crescer com cada um.

Ao dr. Carlos Cardoso por ter aceite e acompanhado parte do meu estágio no Laboratório Dr. Joaquim Chaves.

À dra Ana Couto pelo acolhimento e acompanhamento com que sempre me ajudou no core laboratorial.

À dra Maria do Carmo pelas inúmeras lâminas de patologia que todos os dias tinha para me mostrar e com quem aprendi muito.

À dra Graça Barrento pelo acolhimento e acompanhamento na Química analítica do Laboratório Dr. Joaquim Chaves.

À dra Luísa Loreto e à Gina pelo acolhimento e acompanhamento no Labquer.

Ao dr. Paulo Ferreira pela disponibilidade do microscópio para rever algumas lâminas e pela discussão de alguns casos.

À Professora Aida Duarte agradeço pelo acompanhamento e discussão da tese e dos seus resultados, e pelas suas sugestões, dicas e críticas.

À Professora Cristina Marques pelo apoio e pelo estímulo que foram essenciais à conclusão do trabalho.

Um agradecimento especial vai para o Eng. Plácido Gomes, amigo para todas as horas, pela revisão integral do texto, formatações e paginação.

Um agradecimento especial vai também para os meus amigos mais próximos, companheiros de muitas aventuras e que nestes últimos tempos com muita paciência souberam aceitar e preencher as minhas ausências, de entre estes, o agradecimento mais especial vai à Guida, à Paula, ao César, ao Eugénio, ao Carlos e ao Tobé.

Um agradecimento especial, por fim à minha família, sem eles não teria chegado aqui. Agradeço ao meu irmão Alexandre e aos meus pais que sempre me acompanharam, ajudaram, estimularam e foram inspiração e exemplo.

Lisboa, Janeiro de 2012

Rui Sérgio Mendes Leite Pereira da Cunha

Texto redigido em conformidade com o acordo ortográfico da língua portuguesa em vigor desde 2009